

Molekulare Mechanismen und strukturelle Dynamik der Interaktion des leukozytären Adhäsionsrezeptors L-Selektin mit intrazellulären Liganden

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt – Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Figen Beceren-Braun

Präsident der Humboldt – Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Rudolf Tauber
 2. Prof. Dr. Wolfgang Lockau
 3. Prof. Dr. Werner Reutter

Dissertation eingereicht am 8. November 2011

Tag der mündlichen Prüfung 11. Mai 2012

Annem ve babama...

(An meine Eltern)

~ Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt ~

(Marie Curie)

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT	V
ZUSAMMENFASSUNG	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Immunsystem und die Leukozytenextravasation	1
1.2 Zelladhäsionsmoleküle und Signale	4
1.2.1 Selektine	4
1.2.2 Sialomucine und weitere Selektinliganden.....	5
1.2.3 Die Integrine	6
1.2.4 Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAMs)	6
1.2.5 Chemokine und ihre Rezeptoren	8
1.3 Funktionen der einzelnen Domänen der Selektine	9
1.4 Cytoplasmatische Interaktionspartner von L-Selektin	11
1.4.1 Cytoskelett-Proteine	11
1.4.2 Calmodulin und die Regulation des L-Selektin-Sheddings.....	13
1.4.3 L-Selektin-vermittelte Signalgebungsprozesse nach Ligandbindung	16
1.4.4 Regulation von L-Selektin durch zelluläre Signalgebungsprozesse.....	17
1.4.5 PhapII und die Regulation der Phosphorylierung von L-Selektin.....	19
1.4.6 Struktur der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin	21
1.5 Zielsetzung.....	23
2 MATERIALIEN	24
2.1 Antikörper.....	24
2.2 Bakterienstämme	25
2.3 Hefestämme	25
2.4 Zelllinien.....	25
2.5 Vektoren	26
2.6 Oligonukleotide	27
2.7 Synthetisierte LScyto-Peptide	29
3 METHODEN	30
3.1 Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1 Arbeiten mit DNA	30
3.1.2 Arbeiten mit RNA	36

3.2	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	38
3.2.1	Kulturbedingungen.....	39
3.2.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
3.3	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
3.3.1	Kulturbedingungen.....	40
3.3.2	Langzeitlagerung von <i>S. cerevisiae</i>	41
3.3.3	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i>	42
3.4	Arbeiten mit humanen Zelllinien	42
3.4.1	Kulturbedingungen.....	42
3.4.2	Langzeitlagerung von humanen Zelllinien.....	43
3.4.3	Zellzahlbestimmung	43
3.4.4	Transfektion von HEK-293-Zellen nach der Calciumphosphat-Methode .	44
3.4.5	Isolierung von Zellen	44
3.5	Proteinchemische Methoden	45
3.5.1	Cytokin-Array	45
3.5.2	Expression rekombinanter Proteine	47
3.5.3	Herstellung von Gesamtzelllysaten aus Jurkat- und HEK-293-Zellen	52
3.5.4	<i>In vitro</i> -Bindungsassay (GST-Pull-Down-Assay)	53
3.5.5	Analyse von Proteinen mittels Massenspektrometrie	53
3.5.6	Phosphatase-Assay	53
3.5.7	Oberflächenplasmonresonanz („BIAcore“)	55
3.5.8	Proteinbestimmung mittels BCA (Bicinchoninic acid).....	57
3.5.9	Entsalzung und Konzentrierung von Proteinlösungen	57
3.5.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
3.5.11	Coomassie-Blaufärbung	58
3.5.12	Silberfärbung.....	59
3.5.13	Chromatographische Trennverfahren.....	59
3.6	Immunologische Methoden.....	63
3.6.1	Western Blot-Analyse	63
3.6.2	Durchflusszytometrie	64
3.7	Kristallographische Methoden	65
3.7.1	Kristallisationsscreenings.....	65
3.8	Yeast-Two-Hybrid-Assay	65
3.8.1	Das Yeast-Two-Hybrid-System	65

3.8.2	Konstruktion des <i>Bait</i> -Vektors	66
3.8.3	Hefe-Transformation im kleinen Maßstab	66
3.8.4	Inhibition der Basalexpression des HIS3 Reportergens	67
3.8.5	Test auf Toxizität des <i>Bait</i> -Konstrukts	67
3.8.6	Präparation von Hefeproteinextrakten	67
3.8.7	Transformation der cDNA-Bibliothek im großen Maßstab (Screen)	67
3.8.8	Selektion positiver Klone	68
3.8.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen	69
3.9	Software und Datenbanken	69
4	ERGEBNISSE	70
4.1	Charakterisierung der Interaktion von PhapII mit L-Selektin	70
4.1.1	Konstruktion von LScyto-Deletionsmutanten	70
4.1.2	Identifizierung der PhapII-Bindungsstelle von LScyto	71
4.1.3	Konstruktion von phapII Δ C-Deletionsmutanten	72
4.1.4	Expression und Reinigung der PhapII-Deletionsproteine	72
4.1.5	Lokalisation der LScyto-Bindungsstelle von PhapII	73
4.1.6	Mutation der Phosphorylierungsstelle Ser-9 von PhapII	75
4.2	Rolle von PhapII beim L-Selektin vermittelten Signalling	77
4.2.1	Dephosphorylierung von LScyto durch PP2A	78
4.2.2	Einfluss von PhapII-Mutanten auf die PP2A-Aktivität	82
4.3	Konstruktion, Expression und Charakterisierung von PhapII	83
4.3.1	Klonierung von phapII in pET22b (+)	83
4.3.2	Expression mit dem pET22b (+)-Vektor	85
4.3.3	Klonierung von phapII mit Stoppcodon in pET22b (+)	89
4.3.4	Expression und Reinigung von PhapII ohne tag	89
4.3.5	Konstruktion von phapII in pQE-30	94
4.3.6	Expression mit dem pQE-30-Vektor und Reinigung von His-PhapII	96
4.3.7	Konstruktion von phapII in pET45b (+)	98
4.3.8	Expression und Reinigung von PhapII mit N-terminalem His-tag	99
4.3.9	Konstruktion von phapII in pGEX4T-2	109
4.3.10	Expression und Reinigung von GST-PhapII	110
4.3.11	Co-Expression von PhapII und LScyto: Konstruktion und Reinigung	112
4.3.12	LScyto-Affinitätsreinigung von PhapII	115
4.3.13	Expression von PhapII in HEK-293: Konstruktion und Reinigung	116

4.3.14	Kristallisationsversuche	118
4.4	Einfluss von L-Selektin-Antikörper-Aktivierung auf die Cytokinausschüttung von Leukozyten	119
4.4.1	Nachweis der Expression von L-Selektin und zellspezifischen Oberflächenmarkern auf Granulozyten und T-Lymphozyten	119
4.4.2	Cytokinprofil von Granulozyten nach L-Selektin-Ligation	121
4.4.3	Cytokinprofil von T-Lymphozyten nach L-Selektin-Ligation	122
4.5	Identifikation neuer Interaktionspartner von L-Selektin	123
4.5.1	LScyto als <i>Bait</i>	124
4.5.2	Screening mit pGBKT7-3x-LScyto	127
4.5.3	Charakterisierung des Filamin-Bindeproteins 1 (FBLP-1)	131
5	DISKUSSION	133
5.1	Interaktionen der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin	133
5.2	Versuche zur Co-Kristallisation von PhapII in Komplex mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin	137
5.2.1	Expression von PhapII in <i>E. coli</i>	137
5.3	Cytokinausschüttung nach L-Selektin-Stimulation	149
5.3.1	Cytokinfreisetzung in Granulozyten	149
5.3.2	Cytokinfreisetzung in T-Zellen	150
5.4	Identifizierung neuer LScyto-Interaktionspartner	152
	LITERATURVERZEICHNIS	157
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	174
	PUBLIKATIONSLISTE	176
	DANKSAGUNG	177
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	178

ABSTRACT

Migration of leukocytes from the lumen occurs in a cascade mediated by different members of adhesion molecules. The first contact of leukocytes to endothelium is initiated amongst other processes by the interaction of L-selectin, which is expressed constitutively on the surface of leukocytes to its endothelial sialomucin ligands.

Besides its role in cell adhesion, L-selectin can induce a set of intracellular signaling pathways and can be a target of serine phosphorylation by protein kinase C (PKC) induced by intracellular signals. But little information on regulation of this serine phosphorylation of L-selectin and therefore regulation of intracellular protein interactions is known. The aim of this thesis was to analyze the cytoplasmic interaction of L-selectin with the inhibitor of protein phosphatase 2A PhapII through identifying the role of PhapII during serine dephosphorylation of L-selectin and searching for other unknown interaction partners of the cytoplasmic domain of L-selectin.

Results show that the basic doublet Lys-365/Arg-366 of the cytoplasmic domain of L-selectin (Lscyto) is essential for binding to PhapII which is mediated by the acidic C-terminal tail of PhapII. Using malachite green based assay to detect free phosphate, cytoplasmic serine residues of L-selectin were dephosphorylated by protein phosphatase 2A (PP2A). In addition, it was possible to identify PP2A as a direct interaction partner of the non-phosphorylated domain of L-selectin in Jurkat T cell lysates by *in vitro* binding assay. This was verified by surface plasmon resonance. The dephosphorylation of Lscyto was prevented by PhapII and points the regulation of serine phosphorylation by PKC, PP2A and PhapII.

For analysis of the interaction of PhapII with L-selectin by co-crystallography, PhapII was recombinantly expressed and purified. Using chromatographic techniques PhapII was observed to be a protein with an intrinsic disorder in its secondary structure. Deletion of the acidic C-terminus and in particular mutation of Serine-9 showed an effect on the conformation of PhapII to a globular and compact protein structure.

Through yeast two-hybrid system, FBLP-1 was identified as a potentially novel interaction partner of the cytoplasmic domain of L-selectin in a leukocyte cDNA library.

Keywords: L-selectin, leukocyte, signaling, phosphatase 2A inhibitor

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wanderung von Leukozyten aus dem Gefäßlumen läuft in einer Kaskade ab, die durch verschiedene Adhäsionsmoleküle vermittelt wird. Dabei wird der erste Kontakt der Leukozyten mit dem Endothel unter anderem durch die Interaktion von L-Selektin auf der Oberfläche von Leukozyten mit seinen endothelialen Sialomucinliganden eingeleitet.

Neben seiner Adhäsionsfunktion kann L-Selektin intrazelluläre Signalwege aktivieren und wird, induziert durch intrazelluläre Signale, an seinen cytoplasmatischen Serinresten durch Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert. Über die Regulation dieser Serinphosphorylierung von L-Selektin und die damit verbundene Regulation cytoplasmatischer Proteininteraktionen ist nur wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der cytoplasmatischen Interaktion von L-Selektin mit dem Proteinphosphatase 2A-Inhibitor PhapII, der Rolle von PhapII bei der Serindephosphorylierung von L-Selektin und die Identifizierung neuer Interaktionspartner der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin.

Es konnte gezeigt werden, dass das basische Duplett Lys-365/Arg-366 der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin essentiell für die Bindung von PhapII ist, die über den sauren C-Terminus von PhapII vermittelt wird. In einem Malachitgrün-basierten Phosphataseassay konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatischen Serinreste von L-Selektin durch Protein Phosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert werden. Ferner konnte mittels *in-vitro*-Bindungsassay in Jurkat-Zelllysaten PP2A als ein direkter Interaktionspartner von nicht phosphoryliertem LScyto identifiziert und mittels Oberflächenplasmonresonanz zusätzlich bestätigt werden. Die Dephosphorylierung von LScyto konnte durch PhapII verhindert werden, was daraufhin deutet, dass an der Regulation der Serinphosphorylierung PKC, PP2A und PhapII beteiligt sind.

Mit dem Ziel, die Interaktion von PhapII mit L-Selektin durch Co-Kristallisation zu untersuchen, wurde PhapII rekombinant exprimiert und gereinigt. Mittels chromatographischer Verfahren konnte PhapII als ein Protein mit intrinsischer Unordnung in seiner Sekundärstruktur beschrieben werden. Die Deletion des sauren C-Terminus bzw. die Mutation an Serin-9 von PhapII zeigten einen Einfluss auf die Konformation von PhapII zu einer kompakteren Proteinstruktur hin. Mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems wurde in einer Leukozyten-cDNA-Bibliothek FBLP-1 als ein möglicher weiterer Interaktionspartner der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin identifiziert.

Schlagwörter: L-Selektin, Leukozyt, Signaltransduktion, Phosphatase 2A Inhibitor

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem und die Leukozytenextravasation

Das Immunsystem nutzt komplex regulierte Mechanismen, um in Wirbeltieren sowohl die Ausbreitung von pathogenen Mikroorganismen als auch von entarteten Zellen abzuwenden. Pathogene Mikroorganismen, die in den Körper gelangt sind, werden zunächst durch das angeborene Immunsystem bekämpft. Dies wird über eine große Anzahl von spezialisierten Zellen realisiert, die bestimmte Strukturen auf den Mikroorganismen erkennen können (Chaplin, 2010). In einer späteren Phase der Immunantwort schaltet sich zusätzlich die adaptive Immunabwehr ein, die sich durch ihre hohe Spezifität in der Erkennung und Eliminierung von Pathogenen auszeichnet und darüber hinaus ein immunologisches Gedächtnis entwickeln kann, das bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen zu einer schnelleren Immunantwort führt (Huston, 1997).

Das Immunsystem setzt sich aus verschiedenen Arten von Zellen zusammen, die sich sowohl morphologisch als auch durch die Expression von Glykoproteindifferenzierungsantigenen auf ihrer Zellmembran unterscheiden (Chaplin, 2010). Im Allgemeinen stammen die Zellen des Immunsystem von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab, die sich im Knochenmark in lymphoide Vorläuferzellen oder in myeloide Vorläuferzellen differenzieren (Huston, 1997) (Abb. 1). Aus lymphoiden Vorläuferzellen differenziert sich die Gruppe der Lymphozyten mit den reifen B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und NK-T-Zellen. Aus myeloiden Vorläuferzellen werden neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten sowie Megakaryozyten, Mastzellen, Monozyten, Thrombozyten (Blutplättchen) und Erythrozyten. Des Weiteren können sich Monozyten zu Makrophagen und dendritischen Zellen differenzieren (Huston, 1997).

Zu der Gruppe der Leukozyten gehören, ausgenommen die Thrombozyten und die Erythrozyten, alle Mitglieder der lymphatischen und myeloiden Zellreihe. Um ihre immunologische Funktion zu erfüllen, sind die Leukozyten in der Lage, die Blut- und Lymphgefäße zu verlassen und in alle Gewebe des Organismus einzuwandern. Dazu nutzen die verschiedenen Untergruppen der Leukozyten unterschiedliche Wege, um an die extravaskulären Orte zu gelangen. Monozyten und Granulozyten wandern direkt in Gewebe, die beschädigt sind, in die Pathogene eingedrungen sind oder in denen eine Entzündung vorliegt, ein (Jutila, 1992). Naive Lymphozyten patrouillieren fortwährend

durch den Körper auf der Suche nach Antigenen, indem sie vom Blut über die hochendothelialen Venolen (HEV) in die sekundär lymphatischen Organe und anschließend zurück in das Blut über die efferenten Lymphe rezirkulieren. Treffen naive Lymphozyten in den lymphatischen Organen auf ein passendes Antigen, werden diese aktiviert, wobei nach einer klonalen Vermehrung und einer Absterbephase die verbleibenden Zellen in Gedächtniszellen differenzieren. Diese Zellen zeigen im Vergleich zu den naiven Lymphozyten ein verändertes Rezirkulationsmuster, indem sie gezielt lymphatische, aber auch nicht-lymphatische Organe wie die Haut oder die Darmmukosa über die postkapillaren Venolen ansteuern (Fabbri et al., 1999).

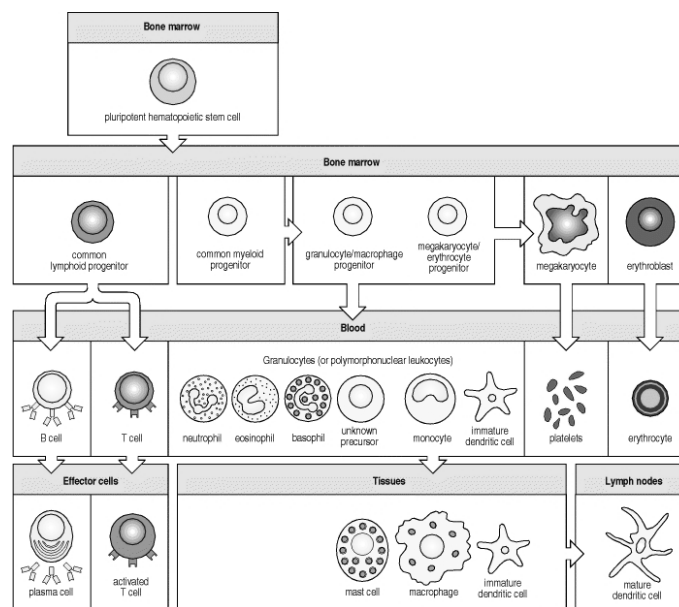


Abb. 1: Die Zellen des Immunsystems.

Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab, die sich im Knochenmark in lymphoide Vorläuferzellen und in myeloide Vorläuferzellen differenzieren. Aus den myeloiden Vorläuferzellen bilden sich im Blut die Granulozyten, Monozyten, unreife dendritische Zellen, Thrombozyten (Blutplättchen) und Erythrozyten, von denen einige weiter differenzieren. Die Gruppe der B- und T-Lymphozyten stammen aus den lymphoiden Vorläuferzellen ab, die sich in Effektorzellen weiter ausbilden können (Abbildung aus Janeway et al., 2002).

Dieser Vorgang des gewebspezifischen *Trafficking* wird als „Homing“ bezeichnet. Ferner sind Gedächtnislymphozyten auch in der Lage, schneller auf Entzündungsereignisse zu reagieren. Die Extravasation von Leukozyten in die postkapillaren Venolen des entzündeten Gewebes oder in die HEV der lymphatischen Organe ist ein kaskadenartig ablaufender Prozess, der durch spezifische Zelladhäsionsmoleküle wie Selektine, Sialomucine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAMs), die

auf der Oberfläche der Leukozyten und dem vaskulären Endothel exprimiert werden, koordiniert wird (Abb. 2).

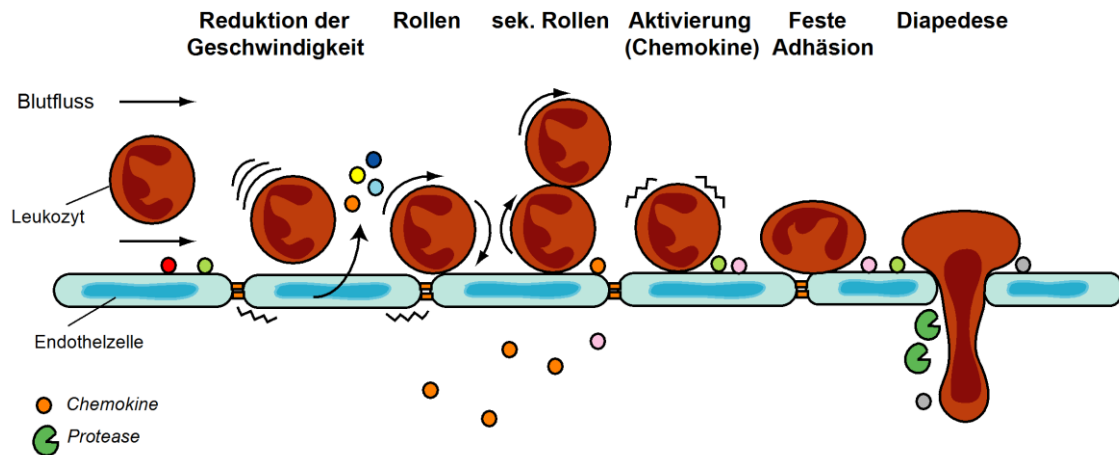


Abb. 2: Die Leukozytenextravasation.

Die Extravasation von Leukozyten ist ein mehrstufiger Prozess, der durch den Kontakt von Adhäsionsmolekülen aus der Familie der Selektine an ihre zugehörigen Sialomucin-Liganden initiiert wird. Der nächste Schritt führt vom Rollen zur festen Adhäsion und erfolgt durch die Mitglieder der Integrine, die für die Bindung an ihre Liganden aus der Ig-CAM-Familie einen chemotaktischen Stimulus benötigen. Schließlich durchqueren die Leukozyten das Endothel und führen ihre Migration entlang des Chemokingradienten fort.

Die Selektine vermitteln dabei den ersten lockeren Kontakt der Leukozyten an das Endothel („*Tethering*“), als dessen Folge ein Leukozytenrollen („*Rolling*“) auf dem Gefäßendothel beobachtet werden kann (Bevilacqua und Nelson, 1993; Bevilacqua et al., 1987; Lasky, 1992). *Tethering* und *Rolling* werden durch die Bindung der Selektine an ihre Liganden aus der Sialomucin-Familie und durch das wieder Lösen der Bindung herbeigeführt. Das Selektin-vermittelte Leukozytenrollen und der Einfluss von Chemokinen führen auch zur Aktivierung von Integrinen. Chemokine sind kleine Moleküle mit einer Größe von 7-10 kDa, die zur Gruppe der Cytokine gehören und eine gerichtete Chemotaxis bei Zellen, die entsprechende Chemokinrezeptoren besitzen, induzieren können. Die sogenannten inflammatorischen Chemokine stellen die größte Gruppe dar, die Zellen an Orte der Inflammation hinführen können (Ward und Marelli-Berg, 2009). Andere Chemokine sind assoziiert mit dem T-Zell-Homing oder der Rezirkulation von naiven Lymphozyten in lymphatische Organe. Die Aktivierung von Integrinen führt zu einer verstärkten Bindung an ihre Liganden aus der Familie der Ig-CAMs, was wiederum zu einer festen Bindung der Leukozyten an das Endothel führt. Nach diesem Schritt können die Leukozyten durch das Endothel migrieren („*Diapedese*“) und innerhalb des Gewebes entlang des Chemokingradienten wandern.

1.2 Zelladhäsionsmoleküle und Signale

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnt, sind an der Migration von Leukozyten unterschiedliche Adhäsionsmoleküle beteiligt, die in den nächsten Unterabschnitten näher beschrieben werden und in Abb. 3 schematisch dargestellt sind.

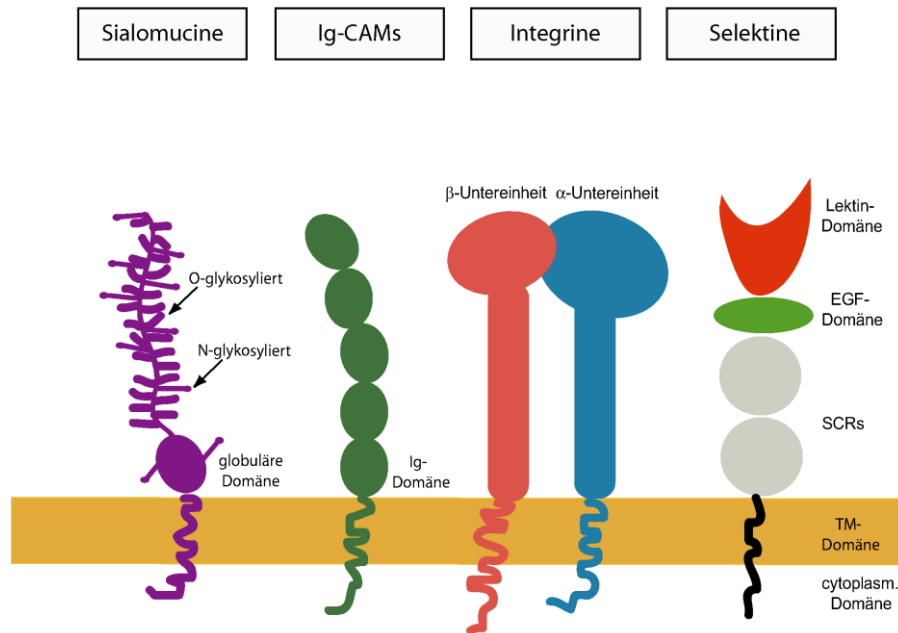


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zelladhäsionsmoleküle.

Dargestellt ist je ein Exemplar aus einer Zelladhäsionsmolekülfamilie, die an der Extravasation von Leukozyten beteiligt sind: CD34 (Sialomucine), ICAM-1 (Immunglobulin-Superfamilie); LFA-1 (Integrine) und L-Selektin (Selektine).

1.2.1 Selektine

Selektine sind eine Familie von drei Typ-I-Transmembranglykoproteinen (E-, L- und P-Selektin) (Kansas, 1996), die auf unterschiedlichen Zelloberflächen exprimiert werden: E-Selektin wird auf aktivierten vaskulären Endothelzellen (Bevilacqua et al., 1987), P-Selektin auf Blutplättchen sowie aktiviertem Endothel (Hsu-Lin et al., 1984) und L-Selektin auf den Mikrovilli von Leukozyten (Fabbri et al., 1999; Gallatin et al., 1983) exprimiert. Unter den Selektinen ist nur die Expression von L-Selektin konstitutiv. P- und E-Selektin werden durch pro-inflammatorische Mediatoren wie $\text{TNF-}\alpha$ induziert. Dabei wird P-Selektin, das bereits in Weibel-Palade-Körperchen gespeichert vorliegt, nach Induktion zur Zelloberfläche gebracht, während E-Selektin auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (McEver, 1994). Selektine haben eine gemeinsame Domänenstruktur, die

aus einer aminoterminalen Calcium-abhängigen Lektindomäne besteht, einer EGF-Domäne, zwei bis neun *short consensus repeats* (SCR), einer Transmembrandomäne und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (Crockett-Torabi, 1998).

1.2.2 *Sialomucine und weitere Selektinliganden*

Die Liganden der Selektine sind spezifische Kohlenhydratstrukturen, die aus Sialinsäure, L-Fucose, D-Galactose, D-Mannose und N-Acetyl-Glukosaminresten bestehen und mit Sulfaten und Phosphatresten modifiziert sein können (Lowe, 1997; McEver, 1994). Das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis X (sLe^X) oder sein Isomer Sialyl-Lewis a (sLe^a) stellen die Prototyp-Struktur dar, die von allen Selektinen erkannt wird (Berg et al., 1992; Foxall et al., 1992; Skinner et al., 1991; Tyrrell et al., 1991). Alle Selektine binden in gewissem Maße an sialylierte und fucosylierte Kohlenhydrate; die hochaffinen Glykoproteinliganden sind jedoch für jedes Selektin unterschiedlich. L-Selektin bindet insbesondere an Sialomucine wie GlyCAM-1 (*glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*), CD34 und MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) (Hemmerich et al., 1994), für die lange Cluster von Sialinsäure-reichen O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten charakteristisch sind (Ebnet und Vestweber, 1999). GlyCAM-1 und CD34 werden auf HEV der peripheren Lymphknoten exprimiert und binden bevorzugt naive Lymphozyten (Hwang et al., 1996; Tedder et al., 1995). MAdCAM-1 hingegen wird in mesenterischen Lymphknoten und den Peyer'schen Plaques exprimiert und ist ein Ligand für das Integrin $\alpha_4\beta_7$ und für L-Selektin (Berg et al., 1993). PCLP (*podocalyxin-like protein*) (Sasseti et al., 1998) und Endoglykan (Fieger et al., 2003), beides Mitglieder der CD34-Familie, stellen ebenfalls Liganden für L-Selektin dar, wobei Endoglykan auch als Ligand für P- und E-Selektin fungieren kann (Kerr et al., 2008). Alle vaskulären L-Selektin-Liganden, die hauptsächlich auf den HEV der peripheren Lymphknoten exprimiert werden und durch den monoklonalen Antikörper MECA-79 identifiziert werden können, werden zusammengefasst und als PNAd (*peripheral node addressins*) bezeichnet. Dazu gehören neben GlyCAM-1, CD34, PCLP und Endoglykan auch die Sialomucine Sgp200, Endomucin und Nepmucin (Grailer et al., 2009). Der hochaffine Ligand für P-Selektin ist das Sialomucin PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), welches auf der Oberfläche von Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen (Moore et al., 1995; Sako et al., 1993) und einigen Endothelzellen (da Costa Martins et al., 2007) exprimiert wird. Darüber hinaus ist PSGL-1 auch Ligand für L- und

E-Selektin (Moore, 1998; Sako et al., 1993). Weitere Interaktionspartner von E-Selektin sind ESL-1 (*E-selectin ligand 1*) (Stegmaier et al., 1995), bestimmte Glykoformen von CD44 (Dimitroff et al., 2001), humanes L-Selektin (Zollner et al., 1997), CD43 (Fuhlbrigge et al., 2006; Matsumoto et al., 2005), sLe^x von β_2 -Integrinen (Kotovuori et al., 1993) und Glykolipide (Alon et al., 1995a). Der Homingrezeptor CLA (*cutaneous lymphocyte-associated antigen*) ist zwar ebenfalls ein Ligand für E-Selektin (Berg et al., 1991), wird aber auf entzündetem Endothel hochreguliert und fungiert dann als L-Selektin-Ligand (Tu et al., 1999).

1.2.3 Die Integrine

Integrine sind Transmembranmoleküle bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, die nichtkovalent miteinander assoziieren (Fabbri et al., 1999). Die α -Untereinheit ist für die Ligandenbindung zuständig, während die β -Untereinheit die Bindung an das Cytoskelett vermittelt. Integrine werden nach der jeweils vorhandenen β -Untereinheit in acht Unterfamilien β_1 - β_8 eingeteilt. Dabei spielen sieben Integrine aus der Unterfamilie der β_1 -, β_2 - bzw. β_7 -Integrine an der Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen eine besondere Rolle und sind in der Tab. 1 aufgeführt. Die meisten dieser Integrine sind auf eine Aktivierung angewiesen, die zu einer Konformationsänderung führt und die Affinität zu ihren Liganden erhöht.

1.2.4 Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAMs)

Ig-CAMs bestehen aus Ig-ähnlichen Domänen, die jeweils zwei 55-75 Aminosäuren auseinander liegende Cysteinreste enthalten, die zur Stabilisierung der Domänenstruktur Disulfidbrücken bilden (Edelman und Crossin, 1991). Die Gruppe der Ig-CAMs ist sehr heterogen und besteht aus den Leukozytenfunktionsantigenen 2 und 3 (LFA-2 und LFA-3), den interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM-1-3), dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), dem Plättchen-Endothel-Zell-Adhäsionsmolekül-1 (PE-CAM-1), MAdCAM-1 und den junctionalen Adhäsionsmolekülen (JAM-A-C) (Tab. 1).

Tab. 1: Mitglieder der Familie der Integrine und Ig-CAMs, die an der Leukozyt-Endothel-Interaktion beteiligt sind.

Adhäsions-molekül	Adhäsions-familie	Expression	Bindungspartner	Adhäsions-familie	Expression	Funktion
LFA-1	Integrine	Leukozyten	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, JAM-A	Ig-CAM	Endothelzellen, Leukozyten, Fibroblasten, Melanozyten, ruhende Leukozyten	Feste Adhäsion, Transmigration, Lymphozyten- <i>Homing</i> , Immunantwort
Mac-1	Integrine	Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Langerhanszellen	ICAM-1, ICAM-2, JAM-C	Ig-CAM	Endothelzellen, Leukozyten, Fibroblasten, Melanozyten	Feste Adhäsion, Transmigration, Immunantwort
gp150, 95	Integrine	Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Langerhanszellen	ICAM-1	Ig-CAM	Endothelzellen, Leukozyten, Fibroblasten, Melanozyten	Feste Adhäsion, Transmigration, Immunantwort
VLA-4	Integrine	Monozyten, Lymphozyten, Basophile, Eosinophile	VCAM-1, ICAM-2, JAM-B	Ig-CAM	Endothelzellen, Leukozyten	<i>Rolling</i> , <i>Tethering</i> , Feste Adhäsion, Transmigration
$\alpha_4\beta_7$	Integrine	Lymphozyten der Lymphfollikel der Mukosa	MAdCAM-1	Ig-CAM	Endothelzellen	Lymphozyten- <i>Homing</i> (<i>Rolling</i> , Feste Adhäsion)
$\alpha_D\beta_2$	Integrine	Makrophagen (rote Pulpa der Milz, Lymphknoten-Medulla, Knochenmark), Lymphozyten (rote Pulpa der Milz, Blut), Granulozyten	ICAM-3, VCAM-1	Ig-CAM	ruhende Leukozyten, aktivierte Endothelzellen	Feste Adhäsion, <i>Homing</i>
$\alpha_E\beta_7$	Integrine	Intraepitheliale Lymphozyten (Darm, Milchdrüsen), T-Zellen (Blut)	E-Cadherin	Cadherine	Epithelzellen	Zell-Zell-Interaktion
LFA-2	Ig-CAM	Thymozyten, reife T-Zellen, NK-Zellen	LFA-3	Ig-CAM	Endothelzellen	Endothel-T-Lymphozyt-Interaktion
PE-CAM-1	Ig-CAM	Endothelzellen, Plättchen, Leukozyten	PE-CAM-1	Ig-CAM	Endothelzellen, Plättchen, Leukozyten	Transendotheliale Migration, Lymphozyten- <i>Homing</i>

Abkürzungen: LFA-1, lymphocyte function-associated antigen 1; Mac-1, macrophage antigen-1; VLA-4, very late antigen 4; ICAM, intercellular adhesion molecule; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; MAdCAM-1, mucosal addressin cell adhesion molecule-1; PE-CAM-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1; JAM, junctional adhesion molecule.

Referenzen: (Alon et al., 1995b; Berg et al., 1993; Berlin et al., 1993; Bochner et al., 1991; Breider, 1993; Carlos et al., 1990; Cepek et al., 1994; Cepek et al., 1993; Dobrina et al., 1991; Elangbam et al., 1997; Elites et al., 1990; Fabbri et al., 1999; Fantone und Ward, 1994; Graber et al., 1990; Grayson et al., 1998; Johnson et al., 1989; Johnson und Jackson, 2008; Kavanaugh et al., 1991; Khan et al., 2003; Krensky et al., 1983; Krensky et al., 1984; Ley et al., 2007; Lobb, 1992; Makgoba et al., 1989; Paulsen, 1992; Rice et al., 1990; Savage et al., 1991; Springer, 1994; Voetseder et al., 1989; Williams et al., 1987).

1.2.5 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine sind im Prozess der Leukozytenmigration von großer Bedeutung, da sie die Integrine aktivieren, die Liganden aus der Familie der Selektine und der Integrine hochregulieren, die E-Selektin-Expression inhibieren oder die proteolytische Abspaltung von L-Selektin induzieren. Darüber hinaus können Leukozyten entlang eines Chemokingradienten wandern, ein Vorgang, der als Chemotaxis bezeichnet wird.

Chemokine können in drei Gruppen unterteilt werden, die klassischen Chemokine, die meist auf Granulozyten und Monozyten wirken, die C-X-C- oder α -Chemokine, die hauptsächlich Neutrophile und nichthämatopoetische Zellen beeinflussen und die C-C- oder β -Chemokine mit einer Wirkung auf Monozyten, Eosinophile und den Lymphozyten (Springer, 1994). Die Rezeptoren der Chemokine sind G-Protein gekoppelte 7-Transmembranrezeptoren, die eine unterschiedliche zelluläre Verteilung zeigen. In Tab. 2 sind die wichtigsten Chemokine aufgeführt, die einen Einfluss auf die Zelladhäsionsmoleküle haben.

Tab. 2: Chemokine und ihre Einflüsse auf Zelladhäsionsmoleküle.

Chemokin	Sezernierende Zellen	Effekt auf andere Zellen	Einfluss auf Zelladhäsionsmoleküle
IL-8	Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Neutrophile, T-Zellen	Neutrophile, naive T-Zellen	Erhöht die Affinität von β_1 -Integrinen zu seinen Liganden; beeinflusst die Mac-1-Aktivierung und Shedding von L-Selektin
SDF-1	Stromazellen	Naive T-Zellen, Vorläufer-B-Zellen, Monozyten	Aktivierung von LFA-1
MIP-1 α	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile	Monozyten, T-Zellen, Basophile, Eosinophile	Hochregulation von Mac-1 oder p150,95. Induziert kurzzeitig eine Erhöhung der VLA-4-Bindung, aber eine langzeitige Erhöhung der VLA-5-Bindung.
MCP-1	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile	Monozyten, T-Zellen, Basophile	Hochregulation von Mac-1, LFA-1 oder p150,95. Induziert kurzzeitig eine Erhöhung der VLA-4-Bindung, aber eine langzeitige Erhöhung der VLA-5-Bindung.
RANTES	T-Zellen, Endothel, Plättchen, Eosinophile	Eosinophile, Basophile, Monozyten, T-Zellen	Hochregulation von Mac-1 oder p150,95. Induziert kurzzeitig eine Erhöhung der VLA-4-Bindung, aber eine langzeitige Erhöhung der VLA-5-Bindung.
SLC	Endothelzellen	TH1-Zellen, TH2-Zellen	Induziert β_2 -Integrin abhängige Adhäsion an ICAM-1

Abkürzungen: SDF-1, stroma cell-derived factor-1; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1 alpha; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; RANTES, regulated-on-activation-normal-T-cell-expressed-and-secreted; SLC, secondary lymphoid-tissue chemokine.

Referenzen: (Cassatella, 1995; Cassatella, 1999; Ebnet und Vestweber, 1999; Janeway et al., 2002; Ley, 2003; Luster, 1998; Taub, 1996; Weber et al., 1999; Yndestad et al., 2003)

1.3 Funktionen der einzelnen Domänen der Selektine

Die Familie der Selektine zeichnen sich durch ihre charakteristische Domänenstruktur aus (siehe Kapitel 1.2.1 und Abb. 3). Trotz ihrer weitgehenden Homologie in den Lektin-, EGF- und SCR-Domänen, zeigen die Transmembran- und die cytoplasmatische Domäne innerhalb der Selektine Unterschiede, die auf spezifische Funktionen dieser Regionen hindeuten. Innerhalb der Lektindomäne liegt die Ligandenbindungsstelle. Diese bindet Calcium-abhängig Glykanstrukturen auf entsprechenden Glykoproteinliganden (Geng et al., 1992). Die EGF-Domäne ist ebenfalls an der Ligandenerkennung und -bindung beteiligt, indem sie direkt mit dem Liganden interagiert oder die Konformation der Lektindomäne stabilisiert (Huang et al., 1997). Den SCR-Domänen, deren Anzahl speziesabhängig und unter den Selektinen variiert, wird ebenfalls eine stabilisierende Funktion zugesprochen. So besitzt das humane L-Selektin zwei SCR-Domänen, das humane E- und P-Selektin hingegen sechs bzw. neun SCR-Domänen (Tedder et al., 1995). Auch für die SCR-Domänen wird ein Einfluss auf die Liganden-Bindungsaktivität vermutet, indem sie die Position der EGF-Lektindomänen auf der Zelloberfläche bestimmen (Watson et al., 1991). Für die korrekte Positionierung von L-Selektin auf den Spitzen der Mikrovilli ist die Transmembrandomäne von Bedeutung (Buscher et al., 2010). Die Expression von L-Selektin auf den Mikrovilli benötigt eine Verankerung mit dem Cytoskelett, die über die Interaktion membranproximaler Aminosäurereste der cytoplasmatischen Domäne mit Cytoskelettlinkerproteinen realisiert wird (Pavalko et al., 1995; von Andrian et al., 1995). Die cytoplasmatische Domäne von P-Selektin vermittelt die Platzierung des neu synthetisierten P-Selektins in Weibel-Palade-Körperchen und α -Granula von Blutplättchen bzw. von endothelialen Zellen (Disdier et al., 1992; Koedam et al., 1992). Die Effizienz der granulären Platzierung von P-Selektin wird durch seine Transmembrandomäne weiter erhöht (Fleming et al., 1998). Dagegen ist die cytoplasmatische Domäne von E-Selektin an der Endozytose von E-Selektin in Endothelzellen beteiligt (von Asmuth et al., 1992). Beiden Selektinen konnte auch eine Rolle in der *Outside-in*-Signalgebung zugewiesen werden wie der Erhöhung der zellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Reorganisation des Cytoskeletts in Endothelzellen (Lorenzon et al., 1998). Die Deletion der cytoplasmatischen Domäne von E-Selektin führte zu einer Blockierung der Liganden-induzierten Assoziation mit dem Cytoskelett und seiner Dephosphorylierung (Yoshida et al., 1998; Yoshida et al., 1996) sowie der Aktivierung des MAPK-Signalweges nach L-Selektin-Crosslinking (Hu et al., 2000). Die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin ist im Vergleich zu jener von E- und P-Selektin

mit 17 Aminosäureresten recht kurz. Diese Domäne ist überdies reich an basischen Aminosäureresten und besitzt drei potenzielle Phosphorylierungsstellen: Ser-364, Ser-367 und Tyr-372 (Abb. 4A). Darüber hinaus konnten in der Maus zwei weitere Isoformen des konventionellen L-Selektins (L-Selektin-c) nachgewiesen werden, L-Selektin-v1 und L-Selektin-v2, die durch alternatives Spleißen entstehen und sich lediglich in ihren cytoplasmatischen Domänen unterscheiden (Furukawa et al., 2008). Die 11 C-terminalen Aminosäurereste von L-Selektin-c sind bei der Spleißvariante L-Selektin-v1 durch 24 neue Aminosäurereste ersetzt und die 8 C-terminalen Aminosäurereste von L-Selektin-v1 sind bei L-Selektin-v2 durch 10 andere Aminosäurereste ausgetauscht (Abb. 4B). Es sind verschiedene Funktionen für die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin bekannt, die in Kapitel 1.4 näher erläutert werden.

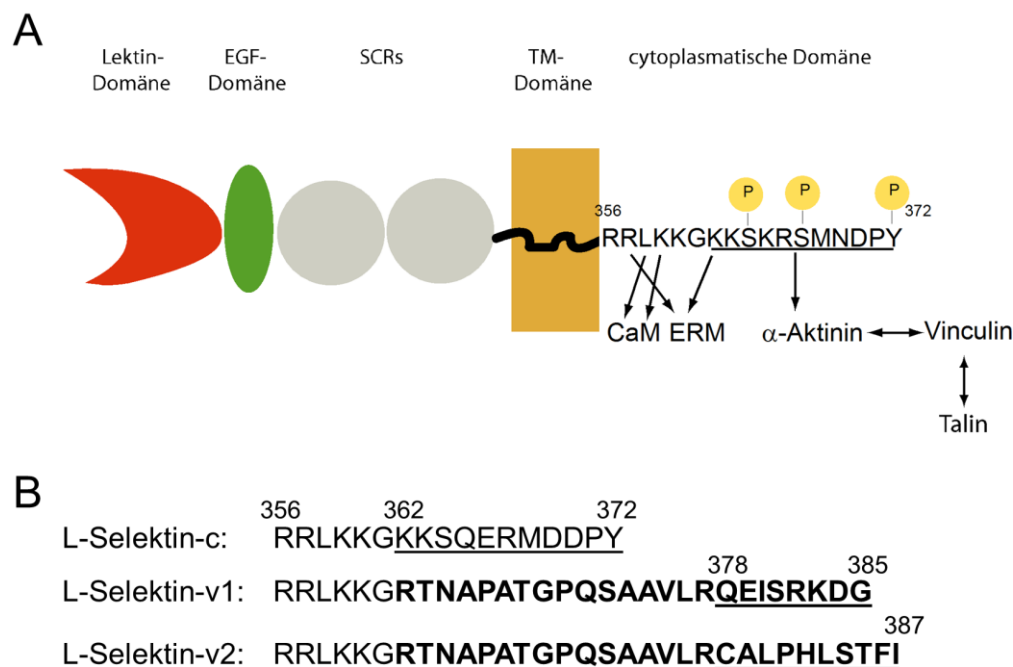


Abb. 4: Schematische Darstellung von humanem L-Selektin und die Aminosäuresequenzen der cytoplasmatischen Domänen von L-Selektin-Isoformen der Maus.

(A) Dargestellt sind neben der typischen Domänenstruktur die Aminosäurereste der cytoplasmatischen Domäne von humanem L-Selektin, die mit verschiedenen Bindungspartnern assoziieren. CaM, Calmodulin; ERM, Ezrin-Radixin-Moesin. (B) Die 11 C-terminalen Aminosäurereste von murinem L-Selektin-c (unterstrichen) sind bei den Spleißvarianten L-Selektin-v1 und L-Selektin-v2 durch neue Aminosäurereste ersetzt (fett gedruckt). Sequenzen, die sich bei L-Selektin-v1 und L-Selektin-v2 unterscheiden, sind außerdem unterstrichen (Abbildung nach Furukawa et al., 2008).

1.4 Cytoplasmatische Interaktionspartner von L-Selektin

1.4.1 Cytoskelett-Proteine

Für eine Reihe von Adhäsionsmolekülen ist eine Interaktion mit dem Cytoskelett beschrieben (Pavalko und Otey, 1994). Diese Bindung bewirkt u. a., dass L-Selektin während der Interaktion mit seinem Liganden stabil bleibt, vermittelt aber auch sowohl die Signalgebung vom Zelläußeren ins Zellinnere (*Outside-In Signaling*) als auch die Signalübertragung aus dem Zellinneren (*Inside-Out Signalgebung*) (Balzar et al., 1998; Clark und Brugge, 1995; Hynes, 1992; Juliano und Haskill, 1993; Rosales et al., 1995; Schwartz, 1992; Williams et al., 1994). Die Interaktion mit dem Aktin-Cytoskelett ist entweder direkt, wie beim α_2 -Integrin (Kieffer et al., 1995), oder wird über das Protein α -Aktinin vermittelt. α -Aktinin ist dafür bekannt, verschiedene Zelladhäsionsmoleküle durch Interaktion mit den cytoplasmatischen Domänen mit dem Cytoskelett zu verbinden. Beispiele hierfür sind die β_1 - (Otey et al., 1990) und die β_2 -Integrine (Pavalko und LaRoche, 1993) sowie ICAM-1 (Carpén et al., 1992), wobei diese Interaktionen eine Aktivierung des Leukozyten voraussetzen. 1995 konnten Pavalko et al. nachweisen, dass die 11 C-terminalen Aminosäurereste der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin mit α -Aktinin interagieren (Abb. 4A). Im Allgemeinen ist die α -Aktinin-vermittelte Verankerung von L-Selektin an das Cytoskelett schwach, kann jedoch durch intrazelluläre Signalgebungsprozesse verstärkt werden. Die Deletion der α -Aktinin-Binderegion *in vitro* führte zu einer Beeinträchtigung des *Tethering*- und Rollverhaltens von Leukozyten (Dwir et al., 2001). Der Ersatz der C-terminalen 11 Aminosäurereste durch andere Aminosäuren, wie sie bei den zwei Spleißvarianten von L-Selektin in der Maus gezeigt wurde, führte zu keiner verminderten Rollgeschwindigkeit, was ebenfalls für eine Beteiligung dieser Aminosäurereste an der Interaktion mit α -Aktinin spricht (Furukawa et al., 2008). Dabei waren die Lokalisation sowohl der Deletionsmutante wie auch der beiden Spleißvarianten von L-Selektin auf den Mikrovilli der Leukozytenoberfläche und die Liganderkennung nicht betroffen (Furukawa et al., 2008; Kansas et al., 1993; Pavalko et al., 1995).

Zwei weitere Cytoskelettproteine, Vinculin und Talin, scheinen ebenfalls an dem L-Selektin- α -Aktinin-Komplex beteiligt zu sein, wobei für beide keine direkte Interaktion mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin nachgewiesen werden konnte (Pavalko et al., 1995) (Abb. 4A). Vinculin ist ein direkter Interaktionspartner von α -Aktinin, Talin nicht. Talin bindet an Vinculin und scheint einen positiven Effekt auf die Affinität von

α -Aktinin an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin zu haben (Pavalko et al., 1995).

Die membranproximalen Aminosäurereste der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin scheinen durch Interaktionen mit anderen cytoplasmatischen Proteinen wie den Mitgliedern der Ezrin/Radixin/Moesin-Familie (ERM) (Sato et al., 1992; Takeuchi et al., 1994) an der Verankerung von L-Selektin auf den Mikrovilli und den sogenannten „*Ruffles*“ beteiligt zu sein (Abb. 4A). Die Mitglieder der ERM-Familie werden als Membran-/Cytoskelett-Crosslinker bezeichnet, da sie integrale Membranproteine wie CD44, PSGL-1, ICAM-1, -2, -3, CD43 und CD31 mit dem kortikalen Aktincytoskelett verbinden. Hierfür scheint die Bindung von N-terminalen Bereichen der Zelladhäsionsmoleküle mit dem C-Terminus von Aktin von Bedeutung zu sein (Ivetic et al., 2004). Die Familie der ERM besteht aus drei Mitgliedern, Ezrin, Radixin und Moesin, die eine weitgehende Homologie in ihrer Aminosäurezusammensetzung (70-80 %) zeigen und wahrscheinlich von einem gemeinsamen Gen evolviert sind, da niedrige Eukaryoten wie z. B. Nematoden nur ein ERM-Gen besitzen (Ivetic und Ridley, 2004a). Die ERM-Proteine können in drei Domänen unterteilt werden: die hoch-konservierte N-terminale FERM (*band Four point one Ezrin Radixin Moesin*)-Domäne, eine zentrale α -helikale Domäne und die C-terminale Aktin-Bindedomäne (Ivetic und Ridley, 2004a). Da der N- und der C-Terminus miteinander interagieren können, liegen die ERM-Proteine in einer sogenannten auto-inhibierten Konformation vor. Erst die Phosphorylierung von spezifischen Threoninresten (Thr-558 bei Moesin, Thr-567 bei Ezrin und Thr-564 bei Radixin) innerhalb der C-terminalen Aktin-Bindedomäne stabilisiert eine aktive offene Konformation. An der Phosphorylierung sind u. a. verschiedene Proteinkinasen beteiligt: Die Interaktion von PKC α mit Ezrin konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, ebenso wie eine PKC α vermittelte Phosphorylierung von Ezrin an Thr-567 (Ng et al., 2001). PKC θ kann Moesin Thr-558 *in vitro* phosphorylieren, aber ob diese Kinasen die ERM-Proteine auch *in vivo* phosphorylieren, ist unklar (Pietromonaco et al., 1998). Die Interaktion von Moesin mit L-Selektin erfolgt ebenfalls nach Phosphorylierung von Moesin, nach Stimulation der Lymphozyten mit PMA, wobei die Bindung von Ezrin an LScyto unabhängig der PMA-Stimulation ist (Ivetic et al., 2002). Während der PMA-Stimulation bindet PKC θ an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin und wird in eine optimale Position rekrutiert, wobei Moesin an Thr-558 phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung überführt Moesin in einen aktiven Zustand, woraufhin dieses an die Zellmembran positioniert wird und mit L-Selektin interagieren kann (Ivetic et al., 2002).

Es ist bekannt, dass ERM-Proteine mit positiv geladenen Aminosäuregruppen an der membranproximalen cytoplasmatischen Domäne von integralen Membranproteinen interagieren (Legg und Isacke, 1998; Yonemura et al., 1998). Die Aminosäurereste Arg-357 und Lys-362 der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin befinden sich ebenfalls im membranproximalen Bereich (Abb. 4A) und spielen bei einer Interaktion mit Moesin eine wesentliche Rolle (Ivetic et al., 2002; Ivetic et al., 2004). Der Austausch von Aminosäuren in diesem Bereich gegen die Aminosäure Alanin führen zum Verlust der Bindung von Moesin an den cytoplasmatischen Teil von L-Selektin. Darüber hinaus weisen Zellen, die die mutierten Proteine exprimieren, ein vermindertes *Tethering*, geringere Lokalisation von L-Selektin an die Mikrovilli sowie eine PMA-induzierte Proteolyse der extrazellulären Domäne (Shedding) von L-Selektin auf (Ivetic et al., 2004). Andererseits besitzen beide L-Selektin-Isoformen der Maus auch ein Arginin- oder Lysinrest an diesen Positionen, so dass die Regulation des Sheddings durch die ERM-Proteine gewährleistet ist (siehe Abb. 4B). Die Sheddingeffizienzen, d. h. das Ausmaß des erfolgten Sheddings, unterschieden sich nur leicht zwischen den drei L-Selektin-Formen und weisen auf eine mögliche Beteiligung der membrandistalen Aminosäurereste der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin hin (Furukawa et al., 2008). In einer aktuellen Studie konnten Buscher et al. (2010) zeigen, dass die Transmembrandomäne von L-Selektin für seine Ausrichtung an den Mikrovilli verantwortlich ist. Dabei wurden die extrazelluläre Domäne, die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin in verschiedenen Variationen gegen die korrespondierenden Domänen von CD44 ausgetauscht. Dabei zeigte sich, dass nur der Austausch der Transmembrandomäne zum Verlust der Verankerung an die Mikrovilli führte. Auch konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen in der ERM-Binderegion innerhalb der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin zur Aufhebung der L-Selektin-Expression an den Mikrovilli führt, so dass den ERM-Proteinen eine stabilisierende Wirkung zugesprochen wird (Buscher et al., 2010; Ivetic et al., 2004).

1.4.2 *Calmodulin und die Regulation des L-Selektin-Sheddings*

Die extrazelluläre Domäne einer Vielzahl von Transmembranglykoproteinen wird proteolytisch gespalten und in den Extrazellularraum freigesetzt (*Shedding*). Dieser Prozess kann durch eine Reihe von Aktivierungsstimuli wie Phorbolester (PMA), Cytokine, Chemokine und durch Crosslinking von Oberflächenrezeptoren induziert werden. L-Selektin ist das einzige Mitglied der Selektin-Familie, das eine

membranproximale Schnittstelle besitzt, die nach Leukozyten-Aktivierung proteolytisch abgespalten wird (Ivetic und Ridley, 2004b). Peschon et al. (1998) konnten erstmalig nachweisen, dass das Shedding von L-Selektin durch die Metalloproteinase 17 (ADAM-17) vermittelt wird, da in ADAM-17-defizienten Thymozyten der Maus dieser Prozess gestört war. In ADAM-17-defizienten Monozyten konnte eine weitere Metalloproteinase, ADAM-8, identifiziert werden, die ebenfalls nach PMA-Stimulation L-Selektin proteolytisch abspalten konnte (Gómez-Gavero et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass der Sheddingprozess innerhalb von fünf Minuten in aktivierten Neutrophilen abgeschlossen sein, in Zelllinien und Lymphozyten dagegen, die rekombinantes L-Selektin exprimieren, über 30 Minuten beanspruchen kann (Peschon et al., 1998; Smalley und Ley, 2005; Walcheck et al., 2003). Abhängig vom Stimulus scheinen unterschiedliche Signalwege am L-Selektin-Shedding beteiligt zu sein. So konnten mit Inhibitionsversuchen gezeigt werden, dass das Shedding nach Stimulation mit PMA und fMLP (N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin) oder nach CD3-Crosslinking PKC-abhängig ist. Hierbei spielen Serinreste innerhalb der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin und die Bindung von ERM-Proteinen, die das PKC-abhängige Shedding regulieren, eine Rolle (Ivetic und Ridley, 2004b; Killock und Ivetic, 2010). Andere Stimuli, die ebenfalls L-Selektin-Shedding induzieren können, sind hypertoner Stress (Rizoli et al., 1999), intrazelluläre Ansäuerung (Kaba et al., 2008) oder die Einwirkung mechanischer Kräfte während des Neutrophilenrollens (Lee et al., 2007); diese Stimuli sind allerdings p38/MAPK-abhängig. Hier läuft die Regulation des Sheddings wahrscheinlich über die Phosphorylierung des Threoninrestes von ADAM-17 durch p38/MAPK ab, woraufhin das Protein aktiviert und anschließend an die Plasmamembran rekrutiert werden kann. Bei Hemmung von p38/MAPK ist das Shedding indes gestört (Killock und Ivetic, 2010).

Des Weiteren wird der Sheddingprozess über die Bindung von Calmodulin (CaM) an die cytoplasmatische Domäne (LScyto) von L-Selektin reguliert (Kahn et al., 1998). Calmodulin ist ein ubiquitäres Calciumbindeprotein, das als Co-Faktor für verschiedene cytoplasmatische Enzyme fungiert, die Cytoskelett-Architektur beeinflusst und die Funktion von verschiedenen Membranproteinen reguliert (Kahn et al., 1998). Dabei stellen Leu-358 und Lys-359 der membranproximalen Region von LScyto die Calmodulin-Binderegion dar (Abb. 4A). Die Binderegion konnte dadurch ermittelt werden, dass Mutationen in diesem Bereich die Calmodulin-Bindung verhinderten und zur erhöhten Proteolyse von L-Selektin führten (Matala et al., 2001). Die beiden alternativen

Spleißvarianten der Maus besitzen ebenfalls eine Calmodulin-Binderegion, was eine Regulation des L-Selektin-Sheddings über Calmodulin vermuten lässt (Furukawa et al., 2008). Calmodulin liegt in unstimulierten Leukozyten konstitutiv an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin gebunden vor (Ivetic und Ridley, 2004b). Darüber hinaus ist die Bindung Ca^{2+} -abhängig. Die Stimulation von Leukozyten, z. B. mit PMA, induziert die Freisetzung von Calmodulin von der cytoplasmatischen Domäne, was anschließend zum Shedding von L-Selektin führt. Die Calmodulin-Bindung scheint dem Sheddingprozess entgegen zu wirken, indem sie wahrscheinlich eine Konformationsänderung innerhalb der extrazellulären Domäne von L-Selektin induziert, so dass diese der Proteolyse nicht mehr zugänglich ist (Ivetic und Ridley, 2004b). Die Regulation der Calmodulin-Bindung kann über Ca^{2+} -Fluktuationen und Serinphosphorylierung der Bindungspartner nahe der Calmodulin-Binderegion erfolgen (Kahn et al., 1998; Matala et al., 2001). Verschiedene Calmodulin-bindende Proteine sind auch Substrate der PKC, so dass diese nach Stimuli wie PMA direkt aktiviert werden und die beiden Serinreste der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin phosphorylieren können (Haribabu et al., 1997; Kilian et al., 2004). Typische Calmodulin-Bindestellen sind hochbasische Sequenzen, die in verschiedenen Proteinen amphipathische Helices bilden, und entsprechen den Bindestellen für PKC (Chakravarthy et al., 1999). Aufgrund überlappender Bindestellen würde eine Calmodulin-Bindung die Phosphorylierungsstelle von PKC blockieren und umgekehrt das Vorhandensein von Phosphoserinen die Affinität von Calmodulin erniedrigen (Abb. 5).

Neben der cytoplasmatischen Domäne können auch die anderen Domänen von L-Selektin, wie die EGF-Domäne, an dem Sheddingprozess beteiligt sein. Die Deletion der EGF-Domäne führte zu einem nahezu vollständigem Verlust des PMA-induzierten Sheddings, was auf eine Interaktion von ADAM-17 und der EGF-Domäne während des Sheddingprozesses hindeutet (Zhao et al., 2001).

Die Relevanz des L-Selektin-Sheddings für die Leukozytenextravasation ist jedoch nach wie vor nur unzureichend verstanden. So zeigen TNF- α -induzierte Monozyten ein p38/MAPK-abhängiges L-Selektin-Shedding, was darauf hinweist, dass Shedding eine Bedeutung bei der Entzündungsreaktion haben könnte (Killock und Ivetic, 2010). Die Hemmung des Sheddings durch Metalloproteinaseinhibitoren führt zu einem längeren Kontakt von rollenden Leukozyten mit dem entzündeten Endothel, was die Wahrscheinlichkeit des Leukozyten erhöht, durch endotheliale Mediatoren wie Chemokine aktiviert zu werden (Hafezi-Moghadam et al., 2001). Auch die Aktivierung von β_2 -Integrinen wird dadurch erhöht. Shedding von L-Selektin blockiert diese

Aktivierung und ist somit ein Prozess, der der Inflammation entgegenwirkt. Denn die extrazelluläre Proteolyse von L-Selektin ist ein wichtiger physiologischer Prozess, da eine reduzierte Konzentration von L-Selektin im Plasma auf eine entzündliche Erkrankung hindeutet (Donnelly et al., 1994).

1.4.3 *L-Selektin-vermittelte Signalgebungsprozesse nach Ligandbindung*

Die Bindung des Adhäsionsrezeptors L-Selektin an seinen Liganden hat neben dem initialen Kontakt des Leukozyten an das Endothel während der Extravasation auch die Initiierung einer Reihe von intrazellulären Prozessen zur Folge. So werden in Lymphozyten und Neutrophilen nach L-Selektin-Ligation mit monoklonalen anti-L-Selektin-Antikörpern L-Selektin, MAPK und weitere zelluläre Proteine an ihren Tyrosinresten phosphoryliert (Brenner et al., 1996; Waddell et al., 1995). Im Falle von L-Selektin wird der C-terminale Tyrosinrest phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wird durch p56^{lck}, einer Nicht-Rezeptorproteintyrosinkinase der Src-Familie, die über ihre SH2 (*Src homology 2*)-Domäne an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin gebunden vorliegt, initiiert (Brenner et al., 1996; Xu et al., 2008). Nach Tyrosinphosphorylierung assoziiert L-Selektin mit Mitgliedern der GEF (*guanine nucleotide exchange factors*), was zu einer Signalweiterleitung und schließlich zur Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), Cytoskelettumlagerungen und O²-Synthese führt (Brenner et al., 1996; Brenner et al., 1997). Aktivierte JNK transloziert in den Nukleus, wo sie Transkriptionsfaktoren wie c-Jun phosphorylieren kann (Minden et al., 1995). Während der T-Zellaktivierung werden Gene exprimiert, worunter sich c-jun oder die α -Kette vom IL-2-Rezeptor befindet. Die Aktivierung des IL-2-Promotors benötigt zusätzlich die Interaktion von einer Reihe von Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NF- κ B und NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) (Crabtree, 1989). Die Aktivität von AP-1 ist zum einen reguliert über die Transkription der *c-jun*- oder *c-fos*-Gene und zum anderen über post-translationale Modifikationen der Proteine wie die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK oder c-Abl, einer weiteren Nicht-Rezeptorproteintyrosinkinase (Brenner et al., 1997; Chen et al., 2008).

Die Stimulation von Jurkat T-Lymphozyten mit monoklonalen anti-L-Selektin-Antikörpern führt neben der p56^{lck}-vermittelten Signaltransduktion auch zur Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase (Brenner et al., 1998). Sphingomyelinasen hydrolysieren das Sphingomyelin der Zellmembran in Ceramide und stellen einen p56^{lck}-unabhängigen

Signalweg dar, der überdies evolutionär hochkonserviert ist (Hannun, 1994). Ceramide sind sekundäre Botenstoffe, die in verschiedenen zellulären Vorgängen involviert sind und ebenfalls JNK und Transkriptionsfaktoren wie NF κ -B und c-Myc aktivieren können.

Ferner führt die Aktivierung von L-Selektin mit Sulfatiden (sulfatierte Galaktosylceramide), die natürliche Liganden nachahmen, in Neutrophilen zur Expression der mRNA der Cytokine TNF- α und IL-8 (Laudanna et al., 1994). Crosslinking von L-Selektin erhöht darüber hinaus die cytosolische Ca²⁺-Freisetzung in Neutrophilen, peripheren Blutlymphozyten und Monozyten oder erhöht die Oberflächenexpression von Mac-1 in Neutrophilen (Crockett-Torabi et al., 1995; Laudanna et al., 1994). Außerdem bringt das Crosslinking von L-Selektin die β_2 -Integrine LFA-1 und Mac-1 in räumliche Nähe zu L-Selektin, wobei die β -Kette der beiden β_2 -Integrine mit L-Selektin assoziieren können (Simon et al., 1999). In Neutrophilen führt die Ligation von L-Selektin zu einer Aktivierung von p38/MAPK, was die Freisetzung der sekundären, tertiären und sekretorischen Granula einleitet. Die L-Selektin-Ligation dient jedoch auch als Co-Stimulus, der die Degranulation nach IL-8-Stimulation verstärkt (Smolen et al., 2000).

Weiterhin wird in peripheren Blutlymphozyten nach L-Selektin-Crosslinking oder Bindung an Sulfatide die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 von SDF-1 erhöht und deren Internalisierung inhibiert, was zu einer erhöhten Aktinpolymerisierung in Anwesenheit von SDF-1 führt. Die gleichzeitige Stimulation der Lymphozyten über L-Selektin und SDF-1 hat ferner einen Einfluss auf die β_2 -Integrin-Aktivierung, Adhäsion und Transmigration (Ding et al., 2003).

1.4.4 Regulation von L-Selektin durch zelluläre Signalgebungsprozesse

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Stimulation verschiedener Rezeptorsysteme einen Einfluss auf die L-Selektin-Bindungsaktivität für seine Liganden haben. Dies deutet darauf hin, dass der Adhäsionsrezeptor L-Selektin mit anderen Rezeptoren in Verbindung steht beziehungsweise durch Signalkaskaden beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang wurden Interaktionen mit dem T-Zell-Rezeptor und Chemokinrezeptoren nachgewiesen. So konnten Murakawa et al. (1992) eine Assoziation zwischen L-Selektin und der ζ -Kette des TCR/CD3-Komplexes zeigen. Crosslinking des T-Zell-Rezeptors führte dabei zu einer erhöhten L-Selektin-abhängigen Bindung der Lymphozyten an die HEV (Spertini et al., 1991), die allerdings durch den Serin-Threonin-

Kinase-Inhibitor Staurosporin verhindert werden konnte und auf eine Proteinkinase-Aktivität hindeutete (Haribabu et al., 1997).

Tatsächlich binden verschiedene Isozyme der Proteinkinase C-Familie, wie PKC θ und PKC α , an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin nach T-Zell-Rezeptor-Crosslinking und phosphorylieren diese an ihren Serinresten (Kilian et al., 2004). Die Familie der Proteinkinase C besteht aus 12 Mitgliedern, die in unterschiedliche Signalgebungs-vorgänge involviert sind (Dempsey et al., 2000; Way et al., 2000). PKC θ ist eine neuartige PKC-Isoform, die Calcium-unabhängig ist und beispielsweise in Skelettmuskeln, lymphatischen Organen und hämatopoetischen Zellen, insbesondere in den T-Zellen, exprimiert wird (Baier et al., 1993; Chang et al., 1993; Osada et al., 1992). In unstimulierten T-Zellen ist PKC θ im Cytoplasma lokalisiert.

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt nach Crosslinking des T-Zell-Rezeptors oder über die gleichzeitige Stimulation des T-Zell-Rezeptors und einem costimulatorischen Rezeptor wie CD28. Dabei wird PKC θ an Tyr-90 ihrer regulatorischen Domäne von der Proteintyrosinkinase p56^{lck} phosphoryliert (Liu et al., 2000; Wange, 2000). Die Assoziation der beiden Proteine ist konstitutiv und wird nach T-Zell-Aktivierung erhöht. Für die Translokation an die Zellmembran benötigt PKC θ Diacylglycerol (DAG), einen sekundären Lipidbotenstoff, der nach TCR-vermittelter Aktivierung von Phospholipase C γ produziert wird (Manicassamy et al., 2006). Während der p56^{lck}-vermittelten T-Zellstimulation kann PKC θ JNK aktivieren, was die Expression von IL-2 sowie der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 induziert (Ghaffari-Tabrizi et al., 1999). PKC α hingegen reguliert wahrscheinlich über die Phosphorylierung der Raf-1-Kinase die MAP-Kinasen Erk-1 und Erk-2 (Webb et al., 2000). Insgesamt scheint die Art der Interaktion der PKC mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin Isozym-spezifisch zu sein. So interagieren nur PKC θ und die atypische Proteinkinase C ι mit der nicht-phosphorylierten Domäne von L-Selektin, wobei die konventionelle PKC α nur nach TCR/CD3-Stimulation und somit Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin an diese bindet (Kilian et al., 2004). Die Phosphorylierung bewirkt zusätzlich eine Verstärkung der PKC θ -Bindung an L-Selektin.

Die Stimulation von Neutrophilen mit G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating-factor*) oder TNF- α führen ähnlich wie die Stimulation von T-Zellen über den TCR/CD3-Komplex (s. o.) zu einer erhöhten Bindungsaktivität von L-Selektin. Dabei scheint die verstärkte Bindung nicht mit der Erhöhung der Oberflächenexpression von L-Selektin einherzugehen, sondern ist auf die

Phosphorylierung von Serinresten der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin zurückzuführen (Spertini et al., 1991). Haribabu et al. (1997) konnten in lymphoblastischen Zellen, die mit L-Selektin und den Chemokinrezeptoren von fMLP, IL-8 oder PAF co-transfiziert wurden, zeigen, dass L-Selektin nach Stimulation mit entsprechenden Chemokinen PKC-vermittelt phosphoryliert wird.

Auch die Stimulation mit dem Phorbolester PMA aktiviert direkt die Proteinkinase C, da es Oberflächenrezeptoren umgeht (Waddell et al., 1995) und DAG imitiert, den natürlichen Liganden und Aktivator von PKC.

1.4.5 *PhapII und die Regulation der Phosphorylierung von L-Selektin*

PhapII (*putative HLA-associated protein II*) wurde von Kilian (2002) als ein Interaktionspartner von L-Selektin identifiziert. Das Protein wurde unabhängig von verschiedenen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Funktionen nachgewiesen und ist daher unter mehreren Bezeichnungen bekannt wie TAF-1 β (*template activating factor 1 β*), SET (*suppressor of variegation, enhancer of zeste and Trithorax*) oder I2PP2A (Inhibitor 2 der Protein Phosphatase 2A). Ursprünglich wurde es in Fusion mit dem vermeintlichen Onkogen CAN gefunden, das bei der akuten undifferenzierten Leukämie (AUL) eine Rolle spielt (von Lindern et al., 1992). Das PhapII-Protein wird ubiquitär in verschiedenen humanen Zelllinien exprimiert und liegt als Dimer vor, das über die hydrophobe Interaktion der beiden Grundhelices (Aminosäurereste 25-78) in anti-paralleler Weise gebildet wird (Adachi et al., 1994; Karetsou et al., 2009; Muto et al., 2007). Die stark saure Region im C-Terminus ist für Histon-Chaperon- bzw. Kern-Histonbindungsaktivität essenziell (Matsumoto et al., 1999; Muto et al., 2007; Okuwaki und Nagata, 1998). Als Teil des 270-420 kDa großen SET-Komplexes im ER besitzt PhapII eine Schlüsselfunktion in dem durch zytotoxische T-Zellen induzierten Zelltod, indem es die Granzym-A eingeleitete Caspase-unabhängige Nuklease-Aktivität vermittelt (Fan et al., 2003; Lieberman und Fan, 2003). Weiterhin stimuliert PhapII die Replikation von adenoviraler Kern-DNA und fungiert als nichtkompetitiver Inhibitor von PP2A (Protein Phosphatase 2A), einem Protein, das als einer der wichtigsten Serin-/Threonin-Phosphatasen in Säugerzellen an der Regulation verschiedener zellulärer Vorgänge wie Zellteilung, Genexpression und Signalling beteiligt ist (Li et al., 1996; Matsumoto et al., 1993). Als negativer Regulator der PP2A-Aktivität scheint PhapII für viele Signaltransduktionsvorgänge von Bedeutung zu sein. Der Mechanismus, wie PhapII mit

der katalytischen Aktivität von PP2A interferiert, ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass die inhibitorische Aktivität von PhapII spezifisch für PP2A ist, da es nicht mit weiteren bekannten Protein-Phosphatasen wie PP1, PP2B und PP2C, die eine ähnliche zelluläre Funktion wie PP2A haben, interagiert (Fan et al., 2003). Die N-terminale Region zwischen den Aminosäuren 25-119 von PhapII ist als eine mögliche Inhibitor-domäne für PP2A beschrieben (Saito et al., 1999).

In Signaltransduktionsvorgängen stellt die Protein-Phosphatase 2A einen Gegenspieler zu der Proteinkinase C dar. Die Aktivität von PKC wird neben der Bindung von Lipid-Cofaktoren und gegebenenfalls Ca^{2+} an ihre regulatorische Domäne (Altman et al., 1992) auch über Trans- und Autophosphorylierung von Serin- und Threoninresten ihrer katalytischen Domäne reguliert (Keranen et al., 1995). Dennoch könnten andere Mitglieder der PKC-Familie davon abweichend reguliert sein. So zeigt beispielsweise PKC θ eine konstitutive Phosphorylierung seiner Trans- und Autophosphorylierungsstellen (Freeley et al., 2005; Liu et al., 2002) oder wird an Thr-538 seiner Transphosphorylierungsstelle von PDK1 (*Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1*) phosphoryliert (Lee et al., 2005). Thuille et al. (2005) konnten allerdings zeigen, dass nach Crosslinking des T-Zell-Rezeptors PKC θ an Thr-219 ihrer regulatorischen Domäne phosphoryliert werden kann. Die Mutation dieser Phosphorylierungsstelle hatte keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität oder die Bindung von PKC θ an DAG, aber beeinträchtigte die Translokation der Kinase an die Zellmembran. PKC α ist hingegen erst nach Phosphorylierung an Thr-497, Thr-638 und Ser-657 ihrer katalytischen Domäne katalytisch aktiv (Parekh et al., 2000) und kann *in vitro* durch die Dephosphorylierung von PP2A inhibiert werden (Ricciarelli und Azzi, 1998). Nach Aktivierung transloziert PKC α vom Cytosol an die Zellmembran, das auch für PP2A nach Stimulation der Mastzellen mit dem PKC-Aktivator PMA gezeigt werden konnte (Ludowyke et al., 2000). PKC α und PP2A liegen im Cytosol von unstimulierten Mastzellen miteinander assoziiert vor und der Nachweis von PP2A an der Zellmembran korrelierte in COS-Zellen mit der Dephosphorylierung von PKC α (Boudreau et al., 2002; Hansra et al., 1996). PP2A selbst stellt auch ein Substrat für PKC α dar. Obwohl der Phosphorylierungsstatus keinen Einfluss auf die Phosphataseaktivität hat, könnte der Vorgang der Translokation beeinflusst werden (Ricciarelli und Azzi, 1998). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Proteine PKC, PP2A und PhapII als Signal-Modulationskomplex an der Regulation der Phosphorylierung von L-Selektin beteiligt sind (Abb. 5). PhapII bindet an die nicht phosphorylierte cytoplasmatische Domäne von L-Selektin über seinen

C-Terminus, in dem gehäuft saure Aminosäurereste vorkommen. Die Deletion dieses Bereiches von 54 aa Länge führt zu einem völligen Verlust der Bindung an LScyto (Kilian et al., unveröffentlichte Daten). Ferner konnte in Substitutionsanalysen der kompletten cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin (17 aa), in der jede Aminosäure gegen die 20 bekannten Aminosäuren ausgetauscht wurde, gezeigt werden, dass die membranproximalen Aminosäurereste von LScyto, insbesondere die zwei basischen Dubletts, für die Interaktion mit PhapII von essenzieller Bedeutung sind (Kilian et al., unveröffentlichte Daten).

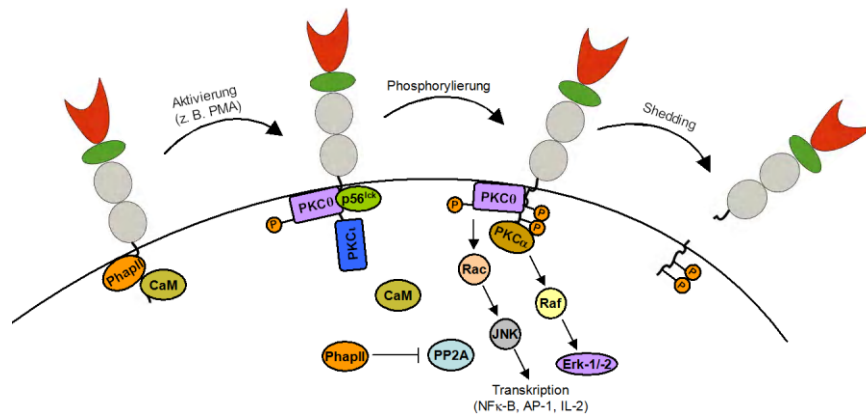


Abb. 5: L-Selektin-vermittelte Signalgebungsvorgänge.

Calmodulin und PhapII binden an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin und verhindern dabei dessen Phosphorylierung. Nach Stimulation mit PMA oder über den TCR/CD3-Komplex werden spezifische PKC-Isozyme aktiviert und assoziieren mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin und phosphorylieren diese. Diese Kinasen können mit p56^{lck} oder dem T-Zell-Rezeptor interagieren und vermitteln verschiedene nachgeschaltete Signalling-Ereignisse.

1.4.6 Struktur der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, sind eine Reihe von Interaktionspartnern bereits beschrieben. Daher stellte sich die Frage, wie eine cytoplasmatische Domäne, bestehend aus nur 17 Aminosäureresten Bindungsmotiv für so verschiedene Proteine darstellen kann. In Vorversuchen konnte mittels CD (Circulardichroismus)-Spektroskopie nachgewiesen werden, dass der cytoplasmatische Teil von L-Selektin in wässrigen Lösungen unstrukturiert ist (Kilian, unveröffentlichte Daten). Bei Anwesenheit von 2,2,2-Trifluorethanol (TFE), einem Lösungsmittel, das Helices in Sequenzbereichen mit einem Hang zur α -helikalen Strukturbildung stabilisiert (Najbar et al., 1997; Sönnichsen et al., 1992), zeigte LScyto einen Übergang in eine α -helikale Struktur abhängig von der Konzentration des TFE. Die Phosphorylierung der

LScyto-Peptide an unterschiedlichen Positionen zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf die Peptidstruktur, behinderte allerdings bei Anwesenheit von TFE die Ausbildung der α -helikalen Struktur (Kilian, unveröffentlichte Daten). Ähnliche Ergebnisse konnten auch Esteve et al. (2003) mit p21^{Cip1}, einem Zellzyklus-assoziierten Protein zeigen, das unter dem Einfluss von TFE eine α -helikale Struktur bildete und unter SDS eine β -Faltblattkonformation. Ferner konnte p21^{Cip1} diese unterschiedlichen Strukturen auch nach Bindung mit verschiedenen Interaktionspartnern ausbilden. So wurde nach Bindung von PhapII die β -Faltblattkonformation induziert, wobei Calmodulin nur an die α -helikale Struktur von p21^{Cip1} binden konnte. Die Fähigkeit von p21^{Cip1}, verschiedene Proteine zu binden, geht also mit multiplen Konformationsänderungen einher. Daher scheint es möglich, dass die unstrukturierte cytoplasmatische Domäne von L-Selektin durch die Bindung an Interaktionspartner eine definierte Struktur ausbildet, die je nach Bindungspartner unterschiedlich ausfallen kann.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin im Verlauf von Signaltransduktionsprozessen zu charakterisieren sowie neue Interaktionspartner zu identifizieren. Darüber hinaus sollte die Struktur der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin während der Bindung an schon bekannte Interaktionspartner wie PhapII aufgeklärt werden.

Zunächst wurden Aufreinigungsstrategien zur Isolierung von PhapII entwickelt, deren Qualität eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Kristallisation ist. Dabei sollte die Interaktion dieses Proteins mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin durch die Kristallographie und durch verschiedene biochemische Methoden weiter charakterisiert werden. Die Assoziation von L-Selektin mit weiteren Signaltransduktionsprozessen sollte im Rahmen eines Cytokinarrays näher untersucht werden. Schließlich sollten Interaktionspartner mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Systems gefunden werden und die putativen Interaktionen in der Hefezelle durch weitere Bindungsmethoden wie z. B. dem Pull-Down-Assay verifiziert und charakterisiert werden. Diese Studien sollten zum Verständnis der Regulation der L-Selektin-vermittelten Signaltransduktion in den Leukozyten beitragen.

2 MATERIALIEN

Alle eingesetzten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma Aldrich (München), Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot), Calbiochem (Darmstadt) und VWR prolabo Chemicals (Darmstadt) mit dem Reinheitsgrad p.a. bezogen. Spezialchemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits sind im Text aufgeführt. Entsprechendes gilt für die verwendeten Geräte, sonstige Materialien und Software.

2.1 Antikörper

Tab. 3: Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie, Western Blot- und Bindungsanalysen.

Antikörper/Spezifität	Isotyp	Herkunft
DREG-200 anti-L-Selektin	Maus IgG ₁	Hybridomazelllinie von E.C. Butcher, Dept. of Pathology, Stanford University (Stanford, USA)
DREG-55 anti-L-Selektin	Maus IgG ₁	Hybridomazelllinie von E.C. Butcher, Dept. of Pathology, Stanford University, (Stanford, USA)
anti-LScyto	Kaninchen polyklonal	P. Donner, Schering (Berlin)
9E10 anti-myc	Maus monoklonal	Hybridomazelllinie von O. Huber, Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum Jena (Jena)
Lam1-116 anti-CD62L/FITC	Maus IgG _{2b}	Ancell (Bayport MN, USA)
anti-GST	Kaninchen polyklonal	J. Wienands, MPI für Immunologie (Freiburg)
SK7 anti-CD3/FITC	Maus IgG ₁ , κ	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
HIB19 anti-CD19/FITC	Maus IgG ₁ , κ	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
G10FS anti-CD66b/FITC	Maus IgM, κ	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Maus IgG ₁ , κ/FITC	Maus IgG ₁ , κ	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
15HG Maus IgG ₁	Maus IgG ₁	Southern Biotech (Birmingham, USA)
UCHT1 anti-CD3	Maus IgG ₁ , κ	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
E-15 anti-I2PP2A	Ziege polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
anti-I2PP2A (PHAPII/SET)	Kaninchen polyklonal	Stratagene (La Jolla, USA)
anti-PP2A (catalytic α)	Maus IgG ₁	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Anti-Penta-His	Maus IgG ₁	Qiagen (Hilden)
Ziege-anti-Kaninchen/HRP	Kaninchen polyklonal	DakoCytomation (Glostrup, DK)
Ziege-anti-Maus	Maus polyklonal	DakoCytomation (Glostrup, DK)
Esel-anti-Ziege/HRP	Ziege polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

2.2 Bakterienstämme

Tab. 4: Verwendete Bakterienstämme für die Plasmidamplifikation und Expression von Fusionsproteinen.

Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F ⁻ Δ lacU169 (σ 80 <i>lacZ</i>) Δ M15 <i>hsdR17 recA1 endA1 supE44 gyrA96 thi¹1⁻</i>	Promega (Mannheim)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B-m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen (Schwalbach)
Rosetta (DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B (r_B⁻,m_B⁻) λ</i> (DE3) pLys (Cm ^R)	Novagen (Schwalbach)
BL21 (DE3) CodonPlus-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS (r_B⁻m_B⁻) dcm⁺Ter^r gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte (argU ileY leuW Cam^r)</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
M15 [pREP4]	M15 mit pREP4	Qiagen (Hilden)
XL1 Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac[F'proAB lacIqZ ΔM15 Tn10 (TetR)]</i>	Stratagene (La Jolla, USA)

2.3 Hefestämme

Tab. 5: Verwendeter Hefestamm für das Yeast-Two-Hybrid-Screening.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>S. cerevisiae</i> AH 109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS} GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS} GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA, USA)

2.4 Zelllinien

Tab. 6: Verwendete humane Zelllinien für die Transfektion und Stimulationsanalysen mit Antikörpern.

Stamm	Eigenschaften	Herkunft
HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie	(Graham et al., 1977)
Jurkat	humane T-Zelllinie aus peripherem Blut eines akut lymphoblastischen Leukämiepatienten	(Schneider et al., 1977)

2.5 Vektoren

Tab. 7: Verwendete Vektoren und vorliegende Konstrukte zur Subklonierung bzw. Expression von Proteinen. Alle weiteren Konstrukte wurden frisch generiert und im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben.

Vektor	Größe	Eigenschaften	Herkunft
pET 22b (+)	5493 bp	Amp ^r ; His ₆ -tag am C-Terminus; T7-Expressionsvektor	Novagen (Schwalbach)
pET 28a (+)	5369 bp	Kan ^r ; His ₆ -tag am N-Terminus; Thrombinschnittstelle; T7-Expressionsvektor	Novagen (Schwalbach)
pET 45b (+)	5260 bp	Amp ^r ; His ₆ -tag am N-Terminus; T7-Expressionsvektor	Novagen (Schwalbach)
pQE-30 Xa	3461 bp	Amp ^r ; His ₆ -tag am N-Terminus; Faktor Xa Protease-Schnittstelle; T5-Expressionsvektor	Qiagen (Hilden)
pETDuet-1	5420 bp	Amp ^r ; His ₆ -tag am N-Terminus; T7-Expressionsvektor mit zwei multiplen Klonierungsstellen	Novagen (Schwalbach)
pGEX4T-2	4970 bp	Amp ^r ; GST-tag am N-Terminus; Thrombinschnittstelle; T7-Expressionsvektor	Amersham Biosciences (Freiburg)
pGEX4T-1	4969 bp	Amp ^r ; GST-tag am N-Terminus; Thrombinschnittstelle; T7-Expressionsvektor	Amersham Biosciences (Freiburg)
pGEX4T-1 (mut)	4969 bp	Amp ^r ; GST-tag am N-Terminus; Thrombinschnittstelle; T7-Expressionsvektor. In den Vektor wurde eine Ser→Ala-Mutation eingefügt, um eine putative Phosphorylierungsstelle innerhalb der MCS zu eliminieren (Kilian et al., 2004).	K. Kilian, Inst. für Laboratoriumsmedizin, Klin. Chemie und Pathobiochemie, Charité
pcDNA6/V5-HisA	5411 bp	Amp ^r ; Blastidicin ^r ; His ₆ -tag am C-Terminus; Thrombinschnittstelle; CMV-Expressionsvektor; T7-Promotor	Invitrogen (Karlsruhe)
pCR3.1	5060 bp	Amp ^r und Kan ^r ; Neomycin ^r ; CMV-Expressionsvektor; T7-Promotor	Invitrogen (Karlsruhe)
pJET1.2/blunt	2974 bp	Amp ^r ; Blunt-DNA-Enden für die Ligation mit Insert; T7-Expressionsvektor	Fermentas (St. Leon-Rot)
pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	3519 bp	Kan ^r ; Blunt-DNA-Enden für die Ligation mit Insert; T7-Expressionsvektor	Invitrogen (Karlsruhe)
pGBKT7	7304 bp	Kan ^r ; TRP1-Selektion in Hefe; c-Myc-tag am N-Terminus; ADH1-Promotor für Expression in Hefe; T7-Promotor; Expression der GAL4 DNA-Bindedomäne	Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View CA, USA)
pGADT7-Rec	8059 bp	Amp ^r ; LEU2-Selektion in Hefe; HA-tag am N-Terminus; ADH1-Promotor für Expression in Hefe; T7-Promotor; Expression der GAL4 DNA-Aktivierungsdomäne; zur Konstruktion von GAL4 AD/cDNA-Datenbank durch homologe Rekombination in Hefe	Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View CA, USA)
pGADT7-Rec2	7588 bp	Amp ^r ; LEU2-Selektion in Hefe; HA-tag am N-Terminus; ADH1-Promotor für Expression in Hefe; T7-Promotor; Expression der GAL4 DNA-Aktivierungsdomäne; Ersatz der 2 μ ori in pGADT7-Rec durch die ARS4 und CEN6-Elemente; Low-Copy-Plasmid	Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View CA, USA)

Vektor	Größe	Eigenschaften	Herkunft
pCR4-phapII	4807 bp	Amp ^r und Kan ^r ; T7-Zwischenvektor mit dem für PhapII codierenden Insert	K. Kilian, Inst. für Laboratoriumsmedizin, Klin. Chemie und Pathobiochemie, Charité
pCR3.1-phapII	5903 bp	Amp ^r und Kan ^r ; Neomycin ^r ; T7-Promotor; CMV-Expressionsvektor mit dem für PhapII codierenden Insert	K. Kilian, Inst. für Laboratoriumsmedizin, Klin. Chemie und Pathobiochemie, Charité
pASK-IBA5-phapII	4082 bp	Amp ^r ; Strep-tag II am N-Terminus; tet-Expressionsvektor mit dem für PhapII codierenden Insert	K. Kilian, Inst. für Laboratoriumsmedizin, Klin. Chemie und Pathobiochemie, Charité
pET28a-phapII	6133 bp	Kan ^r ; His ₆ -tag am N-Terminus; Thrombinschnittstelle; T7-Expressionsvektor mit dem für PhapII codierenden Insert	F. Beceren-Braun, Inst. für Laboratoriumsmedizin, Klin. Chemie und Pathobiochemie, Charité
pGEX4T-1-LScyto (mut)	5188 bp	Amp ^r ; GST-tag am N-Terminus; Thrombinschnittstelle; T7-Expressionsvektor mit dem für LScyto codierenden Insert. In das Konstrukt wurde eine Ser→Ala-Mutation eingefügt, um eine putative Phosphorylierungsstelle innerhalb der MCS zu eliminieren (Kilian et al., 2004).	K. Kilian, Inst. für Laboratoriumsmedizin, Klin. Chemie und Pathobiochemie, Charité
pJET-1-GST-LScyto	3878 bp	Amp ^r ; T7-Zwischenvektor mit GST-LScyto-Insert	F. Beceren-Braun, Inst. für Laboratoriumsmedizin, Klin. Chemie und Pathobiochemie, Charité
pAS2-1/3xLSCD	8541 bp	Amp ^r ; TRP1-Selektion in Hefe; ADH1-Promotor für Expression in Hefe; T7-Promotor; Expression der GAL4 DNA-Bindedomäne und 3xLSCD	K. Kilian, Inst. für Laboratoriumsmedizin, Klin. Chemie und Pathobiochemie, Charité
pGBKT7-p53	8,3 kb	Kan ^r ; TRP1-Selektion in Hefe; c-Myc-tag am N-Terminus; GAL4 DNA-Bindedomäne; ADH1-Promotor für Expression in Hefe; T7-Promotor; Besitzt p53 als Insert	Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View CA, USA)
pGADT7-RecT	10,0 kb	Amp ^r ; LEU2-Selektion in Hefe; GAL4 DNA-Aktivierungsdomäne; ADH1-Promotor für Expression in Hefe; T7-Promotor; Besitzt als Insert das SV40 large T-Antigen	Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View CA, USA)

2.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martiensried) und TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert und sind der Tab. 8 zu entnehmen:

Tab. 8: Name und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz	T _m
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	56,0 °C
T7 ter	5'-TAT GCT AGT TAT TGC TCA G-3'	52,0 °C
Phap f NdeI	5'-CGC ATA TGT CGG CGC AGG CGG-3'	67,6 °C
Phap r Stop	5'-CGC TCG AGG TCA TCT TCT CCT TCA TCC-3'	68,0 °C
PhapII HindIII Kozak fwd	5'-GCC AAG CTT GCC ACC ATG GGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC C-3'	77,7 °C
PhapII XhoI rev.	5'-GCC CTC GAG TTA GTC ATC TTC TCC TTC ATC C-3'	69,5 °C
Phap fwd BamHI	5'-GCGGGATCCATGTCGGCGCAGGCGG-3'	69,0 °C
Phap rev HindIII	5'-CGCAAGCTTTTAGTCATCTTCTCCTTCATCCTCC-3'	64,0 °C
Set dstart intern fwd	5'-CAG AAG AGG TCA GAG CTC ATC GCC AAA ATC CCA-3'	66,0 °C
Cyto Stop 1 HindIII	5'-AAA AAA GGC AAG AAA TAA GCT TCC AAG AGA AGT ATG-3'	70,0 °C
Cyto Stop 2 SpeI	5'-GGC AAG AAA TCC AAG AGA TAA ACT AGT ATG AAT GAC CCA-3'	74,0 °C
Phap257 rev.Xho	5'-GCC TCG AGT CAA CCT TCA TCC TCA TCC CCT TCT TCG TCA ATA-3'	80,0 °C
Phap247 rev.Xho	5'-GCC TCG AGT CAA TCT TCT AAT CCT TCC TCC TCT TCA TCA TCA-3'	78,0 °C
Phap237 rev.Xho	5'-GCC TCG AGT CAA TCA TCA TCT TCT TCT CCT TCT CCT TCT TCA-3'	78,0 °C
Phap227 rev.Xho	5'-GCC TCG AGT CAA TCA TCC ATA TCG GGA ACC AAG TAG TAC TGT-3'	79,0 °C
Set A9 fwd	5'-CAG GCG GCC AAA GTC GCT AAA AAG GAG CTC AAC-3'	76,0 °C
Set E9 fwd	5'-CAG GCG GCC AAA GTC GAG AAA AAG GAG CTC AAC-3'	76,0 °C
5' PCR Primer	5'-TTC CAC CCA AGC AGT GGT ATC AAC GCA GAG TGG-3'	76,0 °C
3' PCR Primer	5'-GTA TCG ATG CCC ACC CTC TAG AGG CCG AGG CGG CCG ACA- 3'	85,0 °C
SMART III Oligo	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ATG GCC GGG- 3'	81,0 °C
CDS III Primer	5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AG-3'	79,0 °C
FBLIM1 NdeI fwd	5'-TTT CAT ATG GCC TCA AAG CCT GAG AAG AGG GTG-3'	74,0 °C
FBLIM1 XhoI rev	5'-TTT CTC GAG TTA GCC AGG ATG ATC TCG ATC TCC-3'	74,0 °C

2.7 Synthetisierte LScyto-Peptide

Die Synthese, Reinigung und Analyse folgender Peptide wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Rudolf Volkmer am Institut für Medizinische Immunologie, Charité durchgeführt:

Bio-LScyto WT	Bio- β ARRLKKGGKKS β KRSMNDPY
Bio-SVC	Bio- β AKLRKDSYRGKPRNKMSK
Bio-LScyto P364	Bio- β ARRLKKGGKKS(PO ₃)KRSMNDPY
Bio-LScyto P367	Bio- β ARRLKKGGKKS β KRS(PO ₃)MNDPY
Bio-LScyto P364+367	Bio- β ARRLKKGGKKS(PO ₃)KRS(PO ₃)MNDPY
LScyto WT	ARRLKKGGKKS β KRSMNDPY

N-terminal biotinylierte Peptide sowie das nicht biotinylierte Peptid wurden im 50 μ mol Maßstab als Amide mittels automatischer Festphasenpeptidsynthese analog des Fmoc-Maschinenprotokolls synthetisiert. Der verwendete polymere Träger war ein Harz des Typs TentaGel™ S RAM mit Rink-Linker-Modifizierung (Fa. Rapp Polymere, Tübingen) und zur Kopplung der Aminosäuren und ggf. Biotin wurde das Reagenz PyBOB (Fa. Novabiochem, Schwalbach) zusammen mit der Base NMM eingesetzt. Die Synthese wurde mit Hilfe eines automatischen multiplen Syntheseroboters (Syro II; Fa. MultiSynTech, Witten) durchgeführt. Die Analyse der Peptide erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC auf einer Vydac C 18-Säule (Fa. Grace, Rottenburg-Hailfingen) in einem linearen Gradienten von 5-60 % Acetonitril/Wasser (0,05 % TFA) für 20 min und einer Flussrate von 1,2 ml/min bei 214 nm. Die Identität der Peptide wurde mittels Massenspektrometrie (MALDI-ToF MS, VoyagerLT; Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) überprüft und bei Bedarf bis zu einer Reinheit von >95 % mit Hilfe der präparativen HPLC auf einer Vydac C 18-Säule gereinigt.

3 **METHODEN**

3.1 **Molekularbiologische Methoden**

3.1.1 *Arbeiten mit DNA*

3.1.1.1 Transformation von Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10-100 ng Plasmid-DNA gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 2 min wurden die Zellen für 3 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 500 µl LB-Medium zugesetzt und eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus 30-100 ml Übernachtskultur („Midi-Präparation“) erfolgte mit dem Nucleobond® PC100-Kit (Machery-Nagel, Düren) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinerem Maßstab („Mini-Präparation“) wurden 5 ml Übernachtskultur eingesetzt und mit Hilfe des Nucleospin-Plasmid-Kits (Machery-Nagel, Düren) nach der Vorschrift des Herstellers präpariert.

TE-Puffer:

10 mM	Tris/HCl pH 8,0
1 mM	EDTA

3.1.1.3 Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und gereinigten PCR-Produkten wurden zwischen 100 ng und 3 µg DNA mit 1 U Endonuklease (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) pro µg DNA in dem entsprechenden 10x Restriktionspuffer (mitgeliefert) für 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Zur Erzeugung von DNA mit glatten Enden (*blunt ends*) wurde nach einem Restriktionsverdau, der *sticky ends* erzeugt, die 5'-Überhänge mit Hilfe des Klenow Fragments (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot), dem langen Fragment der *E. coli* Polymerase I,

aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Analyse der Restriktion mittels Agarose-Gelelektrophorese.

3.1.1.4 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation zu verhindern, wurden einige Vektoren nach dem Restriktionsverdau an den 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe alkalischer Phosphatase (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* = CIAP) dephosphoryliert. Zu einem Ansatz wurden 10x CIAP-Puffer und 0,05 U der CIAP-Phosphatase (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 85 °C für 20 min gestoppt und die Vektor-DNA mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

3.1.1.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch nach Größe in einem 0,8-1,2 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde Agarose in TAE-Puffer durch Kochen gelöst und in eine Agarosegelkammer mit Kamm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer gemischt und in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 70-100 V durchgeführt. Die Größenbestimmung von DNA erfolgte durch Vergleich mit entsprechenden Markern (1-kb- und eine 100-bp-DNA-Leiter, Fa. Invitrogen, Karlsruhe) im Agarosegel. Nach dem Lauf wurden die Agarosegele 10 min in einer 0,001 %-igen Ethidiumbromidlösung inkubiert, 1-2 min mit H₂O gewaschen und unter UV-Licht ausgewertet.

TAE-Puffer (pH 8,2):

40 mM	Tris-Acetat
1 mM	EDTA

6x DNA-Ladepuffer

40 % (w/v)	Saccharose
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau

3.1.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit (Fa. Zymo Research, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die DNA wurde zweimal mit 10-15 µl TE-Puffer (siehe 3.1.1.2) von der Säule eluiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.1.7 Ligation von DNA mittels T4 DNA-Ligase

Bereits geschnittene und gereinigte Insert- und Vektor-DNA wurden unter Verwendung einer T4 DNA-Ligase ligiert. In einen 10 µl-Ligationsansatz wurden 50 ng Plasmid-DNA und ein dreifacher molarer Überschuss der Insert-DNA eingesetzt und 2 min bei 45 °C inkubiert. Anschließend wurden 10x T4 DNA-Ligasepuffer (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) und 1 U T4 DNA-Ligase zugegeben und 4 h bei 22 °C oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Nach Inaktivierung der Ligase bei 65 °C für 10 min wurde der Ligationsansatz kurz auf Eis abgekühlt und je 5 µl zur Transformation von chemisch kompetenten DH5α eingesetzt.

Die Ligation von PCR-Fragmenten zur Subklonierung erfolgte in den Vektoren pJET1.2/blunt und pCR®-Blunt II TOPO® (siehe Tab. 7). 1-5 µl gereinigtes PCR-Produkt mit glatten Enden (*blunt ends*) wurde nach Angaben der Hersteller ligiert.

3.1.1.8 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop ND-1000 (Fa. PEQLAB, Erlangen) nach Abgleichen der Nullwerte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Konzentration wurde auf Basis des Lambert-Beerschen Gesetzes

$$E = \varepsilon * c * d$$

mittels der NanoDrop 1000 Calibration Check Software v3.1.2 (Fa. PEQLAB, Erlangen) berechnet. Dabei stellt c die Nukleinsäurekonzentration in $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, E die dimensionslose Extinktion, ε den molaren Extinktionskoeffizienten in $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und d die Schichtdicke in cm dar.

3.1.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung einer DNA-Sequenz (Amplifikation). Nach einem Denaturierungsschritt lagern sich die sequenzspezifischen Oligonukleotide (Primer) je an einen aufgeschmolzenen DNA-Strang und es erfolgt die Synthese einer komplementären DNA-Kopie durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Ein neues doppelsträngiges DNA-Molekül entsteht, das als *Template* für den neuen Zyklus dient mit *Template*-Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation. In einen typischen Ansatz mit einer hochprozessiven 5'→3' DNA-Polymerase mit zusätzlicher 3'→5' Proofreading-Aktivität wie *Pfu*-Polymerase (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) bzw. *Pwo*-Polymerase (Fa. Roche, Basel, CH) wurden folgende Komponenten zusammengemischt:

50 µl Reaktionsansatz:

5 µl	10x Puffer mit MgSO ₄
0,2 mM	dNTP-Mix
0,3 µM	Primer I
0,3 µM	Primer II
100 ng	<i>Template</i> -DNA
1,25 U	Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O

Die PCR-Reaktion wurde durch Zugabe der Polymerase gestartet und lief unter folgenden Bedingungen ab:

Initiale Denaturierung:	96 °C	2 min
<i>Beginn Zyklus (30x)</i>		
Denaturierung:	96 °C	30 sec
Annealing:	T _m -5 °C	30 sec
Elongation:	72 °C	1 min/ kb
<i>Ende Zyklus</i>		
Abschließende Elongation:	72 °C	10 min

Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Oligonukleotide. Diese lässt sich abhängig von dem GC-Gehalt und Länge der Oligonukleotide nach folgender Formel berechnen:

$$T_m = 59,9 + 41 [\% \text{ GC}] - \left[\frac{675}{\text{Länge des Oligonucleotids}} \right]$$

Zum Nachweis des PCR-Produktes wurde ein 5 µl-Aliquot vom Reaktionsansatz abgenommen und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.1.1.10 Ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der PCR

Ortsgerichtete Mutagenesen wurden durchgeführt mit dem Ziel, einzelne Aminosäuren eines Wildtyp-Proteins auszutauschen oder ein Stoppcodon einzusetzen, um nachfolgend funktionelle Analysen durchzuführen.

Hierzu wird zunächst in einer 1. PCR-Reaktion mit Hilfe einer doppelsträngigen DNA als *Template*, einem Vorwärts (5' → 3')-Primer mit der entsprechenden Mutation und der Phusion High-Fidelity Polymerase (Fa. Finnzymes, Espoo) eine einzelsträngige DNA amplifiziert, die über Gel gereinigt wird und in einer 2. PCR-Reaktion als Primer dient. Zusammen mit einem Rückwärts (5' → 3')-Primer wird dann eine doppelsträngige DNA generiert. In den 1. PCR-Ansatz wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

50 µl Reaktionsansatz:

10 µl	5x Phusion HF-Puffer
200 µM	dNTP-Mix
0,5 µM	Vorwärts-Primer (mit Mutation)
50 ng	<i>Template</i> -DNA
0,02 U	Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O

Die Reaktion wurde mit Zugabe der Phusion DNA-Polymerase gestartet und die 1. PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung: 98 °C 30 sec
Beginn Zyklus (4x)
Denaturierung: 98 °C 10 sec
Annealing: T_m+3 °C 10 sec
Elongation: 72 °C 30 sec/ kb
Ende Zyklus

Die 2. PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung: 98 °C 30 sec
Beginn Zyklus (12x)
Denaturierung: 98 °C 10 sec
Elongation: 72 °C 30 sec/ kb
Ende Zyklus
Abschließende Elongation: 72 °C 5 min

Vom Reaktionsansatz wurden 5 µl für die Agarose-Gelelektrophorese abgenommen und der Rest mit 0,5 U *Dpn* I (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) verdaut. *Dpn* I ist eine Endonuklease, die spezifisch methylierte DNA verdaut, wovon die nicht mutierte, in Bakterien amplifizierte und somit methylierte *Template*-DNA betroffen ist. Somit wurde anschließend nur das neu synthetisierte, mutierte Plasmid in *E. coli* transformiert.

3.1.1.11 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung der PCR-Produkte von Oligonukleotiden und Enzymen erfolgte mit dem DNA Clean & ConcentratorTM Kit (Fa. Zymo Research, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde zweimal mit 10-15 µl TE-Puffer (siehe 3.1.1.2) von der Silikagelsäule eluiert und anschließend die Konzentration im Spektralphotometer gemessen. Die gereinigten PCR-Produkte wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.1.1.12 Kolonie-PCR

Nach einer Klonierung kann zum schnellen Nachweis des gewünschten Inserts direkt mit *E. coli*-Koloniematerial eine PCR ohne vorherige Plasmidisolation durchgeführt werden. Dazu wurden Kolonien in PCR-Röhrchen mit 5 µl 0,5-%ige Triton X-100-Lösung gegeben und 5 min bei RT lysiert. Der lysierte Bakterienklon wurde als *Template* in der folgenden PCR eingesetzt:

25 µl Reaktionsansatz:

2,5 µl	10x <i>Taq</i> -Puffer
1,25 mM	MgCl ₂
0,2 mM	dNTP-Mix
0,25 µM	Primer I
0,25 µM	Primer II
5 µl	lysierter Bakterienklon (<i>Template</i>)
2,5 U	<i>Taq</i> -Polymerase
ad 25 µl	H ₂ O

Die Reaktion wurde mit Zugabe der *Taq*-Polymerase (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) gestartet und die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	96 °C	10 min
<i>Beginn Zyklus (35x)</i>		
Denaturierung:	96 °C	10 sec
Annealing:	55 °C	30 sec
Elongation:	72 °C	3 min
<i>Ende Zyklus</i>		
Abschließende Elongation:	72 °C	10 min

Nach Ende der PCR wurde die Hälfte des Ansatzes mit 6x DNA-Ladepuffer (siehe 3.1.1.5) vermischt und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Kolonien mit dem gewünschten Plasmid wurden über Nacht im LB-Medium angezogen und anschließend zur Isolierung der Plasmid-DNA eine Mini-Präparation durchgeführt.

3.1.1.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde modifiziert nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Für die zyklische Sequenzierung wurde der Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. In einen Ansatz wurden 0,3-1 µg Plasmid-DNA, 10 pmol Primer, 2 µl vom Big Dye Terminator-Mix und 1 µl 5x Sequenzierungspuffer gegeben und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die Kettenabbruchreaktion wurde in einem Thermocycler (TRIO-Thermoblock; Fa. Biometra, Göttingen) nach folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	96 °C	1 min
<i>Beginn Zyklus (25x)</i>		
Denaturierung:	96 °C	10 sec
Annealing:	50 °C	5 sec
Elongation:	60 °C	4 min
<i>Ende Zyklus</i>		
Abschließende Elongation:	72 °C	10 min

Die Reaktionsprodukte wurden über Gelmatrixsäulen (NucleoSEQ Columns; Fa. Machery-Nagel, Düren) von Primern, Polymerase und Salzen nach Angaben des Herstellers befreit und das Volumen des Eluates auf 10 µl in der SpeedVac (Heraeus instruments GmbH, Osterode) eingengt. Anschließend wurden die Proben mit 20 µl Hi-Di™ Formamide (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) vermischt, 3 min bei 95 °C denaturiert und im ABI prism 310 Genetic Analyser (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) ausgewertet.

3.1.2 *Arbeiten mit RNA*

3.1.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Vollblut

Gesunden Probanden wurden insgesamt 20 ml venöses Blut entnommen und in BD Vacutainer® mit 170 IU Natrium-Heparin (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) überführt. Alle nachfolgend durchgeführten Schritte wurden mit RNase-freien Pipettenspitzen, Reaktionsgefäßen, 50 ml-Röhrchen (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) und Lösungen durchgeführt. Der Arbeitsbereich wurde zur Entfernung von RNasen mit RNaseZap® (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Je 5 ml Blut wurden in ein 50 ml-Röhrchen gegeben und dem 5-fachen Volumen Erythrozyten-Lysepuffer (QIAamp RNA Blood Mini Kit; Fa. Qiagen, Hilden) vorsichtig durch Vortexen gemischt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden nach dem Protokoll „Isolation von totaler zellulärer RNA aus Vollblut“ des RNeasy® Midi Kits (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die RNA wurde auf zwei Säulen verteilt und mit je 150 µl DEPC-behandeltem Wasser von den Säulen eluiert. Anschließend wurde die Elution mit zwei je 50 µl DEPC-behandeltem Wasser wiederholt, um die restliche RNA von der Säule zu entfernen. Die ersten Eluate der RNA-Proben wurden vereinigt und nach dem Protokoll „RNA Cleanup“ von QIAamp RNA Blood Mini-Kit weiterbehandelt. Die RNA wurde mit 30 µl DEPC-behandeltem Wasser von der Säule eluiert und anschließend dieser Vorgang zweimal wiederholt. Die Konzentration der Eluate wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm im Spektralphotometer bestimmt und zur Überprüfung der RNA-Integrität 0,5 µl der

einzelnen Eluate mit drei Volumen RNA-Ladepuffer vermischt, 2 min bei 95 °C gekocht und auf ein Harnstoff-Agarosegel aufgetragen. Die isolierte Gesamt-RNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

3.1.2.2 Harnstoff-Agarose-Gelelektrophorese

1 g Agarose wurde in 50 ml 1x TBE-Lösung durch Kochen gelöst. In die handwarme Lösung wurden 5 ml 10 M Harnstoff und 1 µl Ethidiumbromid gegeben und anschließend in eine Agarosegelkammer mit Kamm gegossen. Die in drei Volumen RNA-Ladepuffer vermischten und denaturierten RNA-Proben wurden auf das Harnstoff-Agarosegel aufgetragen und die Gelkammer mit 1x TBE/Harnstoff-Laufpuffer gefüllt. Der Lauf wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V gestartet. Die Auswertung der ribosomalen RNA-Banden erfolgte unter UV-Licht. Alle hergestellten Puffer wurden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt.

1 x TBE/Harnstoff-Laufpuffer (pH 8,3):

89 mM	Tris
2 mM	EDTA
89 mM	Borsäure
1 M	Harnstoff

RNA-Ladepuffer:

8 M	Harnstoff
10 mM	Tris/HCl
1 mM	EDTA
1 % (v/v)	NP-40
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau

3.1.2.3 Synthese von Einzelstrang-cDNA

Die Einzelstrang-cDNA-Synthese erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des Revert Aid H-Minus M-MuLV-Reverse Transkriptase Kits (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) mittels der SMART™ (*Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript*)-Technologie (Zhu et al., 2001). Dabei wird während der cDNA-Synthese zusätzlich zu dem Oligo (dT) Primer das SMART III™ Oligonukleotid eingesetzt, das an seinem 3'-Ende eine Oligo (G) Sequenz besitzt, die mit dem Deoxycytidin-Bereich am 3'-Ende der cDNA Basenpaarungen eingeht und so zu einem verlängerten *Template* führt. Nach der Synthese besitzt die Einzelstrang-cDNA das komplette 5'-Ende der mRNA und eine Sequenz, die komplementär zu dem SMART III Oligonukleotid ist. Diese Sequenz fungiert dann als *Priming Site* in der nachfolgenden Long-Distance-PCR.

Pro Ansatz wurden 2 µg Gesamt-RNA (aus Vollblut), 1 µM CDS III Oligo (dT) Primer gegeben und mit 11 µl RNase freiem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min bei 70 °C denaturiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, und anschließend auf Eis gestellt. Es wurden 1x Reaktionspuffer und 1 mM dNTPs des o.g. Reverse Transkriptase

Kits dazugegeben und bei 37 °C für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 U H-Minus M-MuLV Reverse Transkriptase wurde der Ansatz bei 42 °C für weitere 10 min inkubiert und anschließend 1 µM SMART III Oligonukleotide hinzugefügt. Die Synthese lief bei 42 °C für 1 h und wurde durch eine 10-minütige Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70 °C gestoppt. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz mit 5 U RNase H (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) für 20 min bei 37 °C behandelt, um poly(A)-Sequenzen der mRNA zu entfernen. Zur Überprüfung der Synthese wurde ein Aliquot vom Ansatz mit 6x DNA-Ladepuffer gemischt und auf ein 1,2-%iges Agarosegel aufgetragen. Die Einzelstrang-cDNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.1.2.4 *Long Distance*-PCR (LD-PCR) zur Amplifizierung von ds-cDNA

Die LD-PCR wurde nach Protokoll des MatchmakerTM Library Construction & Screening Kits (Fa. Clontech, Mountain View CA, USA) durchgeführt. Für einen 50 µl-Ansatz wurden 2 µl der Einzelstrang-cDNA (siehe 3.1.2.3) und je 0,4 µM 5'- und 3'-PCR-Primer eingesetzt. Das Ergebnis der PCR wurde auf einem 1,2 %-igen Agarosegel analysiert. Der LD-PCR-Ansatz wurde mit Hilfe des „illustra Gfx PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ (GE Healthcare, Freiburg) nach Protokoll 5.3 von Primern, Nukleotiden und kurzen PCR-Produkten (<0,1 kb) befreit. Nach 4-maliger Elution der cDNA mit je 50 µl H₂O wurde das Volumen auf ca. 20 µl in der SpeedVac eingeeengt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.2.5 Denaturierung von Heringsspermien-DNA

Heringsspermien-DNA wurde bei 95 °C für 5 min erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Der Vorgang wurde wiederholt und die DNA sofort in der Hefe-Transformation verwendet.

3.2 Arbeiten mit *Escherichia coli*

Alle wässrigen Lösungen und Gefäße zur Kultivierung von *E. coli* wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Antibiotika wurden in H₂O gelöst, sterilfiltriert und den Medien nach Abkühlen auf ~55 °C zugegeben. Dem TB-Medium wurden erst nach dem Autoklavieren 100 ml 1x Phosphatpuffer hinzugefügt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar-Agar zugegeben. Die Lagerung der Medien und der Agarplatten erfolgte bei 4 °C.

3.2.1 *Kulturbedingungen*

Die *E. coli*-Stämme DH5 α , BL21 (DE3), Rosetta (DE3)pLysS, BL21 (DE3) CodonPlus-RIL, M15 [pREP4] und XL1 Blue wurden in LB-Medium oder LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen (100 μ g/ml Ampicillin oder 50 μ g/ml Kanamycin) über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Kultivierung von Zellen in dem LB-Medium fand ausschließlich auf einem Schüttelinkubator (190 rpm) statt. Unter osmotischen Stressbedingungen wurden die Zellen in TB-Medium angezogen. Das Wachstum der Kultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm mit einem Spektralphotometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Als Leerwert wurde steriles LB- bzw. TB-Medium verwendet.

LB-Medium (pH 7,5):

1 % (w/v)	Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	NaCl
ad 1 l	H ₂ O

TB-Medium

1,2 % (w/v)	Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)
2,4 % (w/v)	Hefeextrakt
0,4 % (v/v)	Glycerin
ad 900 ml	H ₂ O

1x Phosphatpuffer:

17 mM	KH ₂ PO ₄
72 mM	K ₂ HPO ₄
ad 100 ml	H ₂ O

Antibiotika-Stocklösungen:

Ampicillin:	100 mg/ml
Kanamycin:	50 mg/ml

3.2.2 *Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen*

Kompetente *E. coli*-Zellen (DH5 α , BL21 (DE3), Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3) CodonPlus-RIL, M15 [pREP4]) wurden nach dem Protokoll von Chung et al. (1989) hergestellt.

3.3 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Lösungen und Medien für die Kultivierung und Lagerung von *S. cerevisiae* wurden nach Angaben von Clontech Laboratories Inc. hergestellt.

Alle wässrigen Lösungen und Gefäße zur Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Kanamycin und andere Medienzusätze (Glukose, Galaktose, Raffinose, X-Gal, 3-AT), die nicht autoklavierbar sind, wurden sterilfiltriert und den Medien nach Abkühlen auf ~55 °C zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten (100/20 mm oder 145/20 mm) wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 2 % Agar-Agar hinzugefügt. Die Lagerung der Medien, Lösungen und Agarplatten erfolgte bei 4 °C.

3.3.1 Kulturbedingungen

Für eine 5 ml-Übernachtskultur wurde eine frische (< 2 Monate alt) und im Durchmesser 2-3 mm große Kolonie von einer Selektionsplatte zunächst in 1 ml YPDA- (Vollmedium) bzw. *Synthetic Dropout* (SD)-Medium (Minimalmedium) angeimpft, 1 min gevortext, um Zellklumpen aufzulösen, und anschließend in 4 ml YPDA- bzw. SD-Medium gegeben. Die Zellen wurden 16 h bei 30 °C und 250 rpm geschüttelt.

YPDA-Medium (pH 6,5):

20 g	Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)
10 g	Hefeextrakt
0,003 % (w/v)	Adeninhemisulfat
2 % (w/v)	Glukose
15 mg	Kanamycin
ad 1 l	H ₂ O

SD-Medium (pH 5,8):

6,7 g	<i>Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren)
100 ml	10x <i>Dropout</i> -Lösung
2 % (w/v)	Glukose
15 mg/l	Kanamycin
ggf. je 1ml	100x Adenin, Histidin, Leucin
ggf. 0-25 mM	3-Amino-1,2,4-triazol (AT)
ad 1 l	H ₂ O

Aus den Aminosäuren, die nicht in die 10x *Dropout*-Lösung gegeben wurden (L-Adenin-Hemisulfat, L-Histidin, L-Leucin und L-Tryptophan), wurden 100x Lösungen hergestellt.

10x Dropout-Lösung:

2 g	L-Threonin
je 200 mg	L-Arginin
	L-Methionin
	L-Uracil
500 mg	L-Phenylalanin
je 300 mg	L-Isoleucin
	L-Lysin
	L-Tyrosin
1,5 g	L-Valin
ad 1 l	H ₂ O

Für die Herstellung von verschiedenen SD-Medien und -Agarplatten wurden zusätzlich je 1 ml 100x Adenin, Histidin, Leucin (SD/-Trp) bzw. 1 ml 100x Adenin (SD/-Trp/-Leu/-His) bzw. keine Aminosäure hinzugefügt (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade). Für 3-AT-haltige Agarplatten wurden verschiedene Endkonzentrationen an 3-AT (0 mM; 2,5 mM; 5 mM; 7,5 mM; 10 mM; 12,5 mM; 15 mM; 20 mM) eingesetzt.

SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/Gal/Raf/X- α -Gal-Platten:

6,7 g	<i>Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren)
20 g	Agar-Agar
100 ml	10x Dropout-Lösung
2 % (w/v)	Galaktose
1 % (w/v)	Raffinose
100 ml	10x BU-Salzlösung
15 mg	Kanamycin
80 mg	X- α -Gal
ad 1 l	H ₂ O

10x BU-Salzlösung (pH 7,0):

70 g	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O
30 g	NaH ₂ PO ₄
ad 1 l	H ₂ O

3.3.2 Langzeitlagerung von *S. cerevisiae*

Hefen wurden für einen längeren Zeitraum als Glycerinstocks gelagert. Dazu wurden Kolonien aus einer Agarplatte entnommen und in 500 μ l YPDA- oder bei transformierten Zellen in dem entsprechenden SD-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 500 μ l sterilem 50 % Glycerin (Endkonzentration: 25 %) wurden die Kulturen bei -80 °C eingefroren. Für die Wiederverwendung der Glycerinstocks wurde ein kleiner Teil

abgenommen und auf eine YPDA- oder SD-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert, bis Kolonien einer Größe von ~2 mm Durchmesser gewachsen waren (3-5 Tage). Anschließend wurden die Agarplatten bei 4 °C gelagert.

3.3.3 *Herstellung kompetenter *S. cerevisiae**

Für die Herstellung von kompetenten Zellen wurden mehrere AH109-Kolonien in 1 ml YPDA- oder SD-Medium gegeben, für 5 min unter starkem Vortexen suspendiert und mit dem gleichen Medium auf 50 ml aufgefüllt. Die Kultur wurde bei 30 °C und 230 rpm für 16-18 h bis zu einer OD₅₇₈ von 1,5 inkubiert und am nächsten Tag in 150 ml Medium bis zu einer OD₅₇₈ von 0,2-0,3 verdünnt. Nach einer weiteren Inkubation bei 30 °C und 230 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4-0,6 wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur und 1000 g pelletiert. Das Pellet wurde mit 25-50 ml TE-Puffer gewaschen und anschließend in 0,75 ml frischem TE/LiAc-Puffer resuspendiert.

Für die Herstellung von kompetenten Zellen für den Yeast-Two-Hybrid-Screen wurden einige Kolonien, die das *Bait*-Plasmid enthielten und das Peptid exprimierten, in 1 ml SD/-Trp-Medium angeimpft und 5 min unter Vortexen vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mit SD/-Trp-Medium auf 5 ml gebracht und 8 h bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 50 ml SD/-Trp-Medium so weit verdünnt, dass nach einer weiteren Inkubation für 16-20 h die OD₅₇₈ 0,2-0,3 erreicht wurde. Die Zellen wurden danach für 5 min bei Raumtemperatur und 700 g pelletiert und in 100 ml frisches SD/-Trp-Medium bis zu einer OD₅₇₈ von 0,1 verdünnt. Nachdem die Zellen sich bei 30 °C zweimal verdoppelt hatten, wurden sie für 5 min bei Raumtemperatur und 700 g zentrifugiert und in 60 ml sterilem H₂O aufgenommen. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 3 ml 1,1x TE/LiAc-Lösung aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt, bei maximaler Geschwindigkeit für 15 sec zentrifugiert und je Pellet in 600 µl 1,1x TE/LiAc-Lösung resuspendiert.

3.4 Arbeiten mit humanen Zelllinien

Sämtliche Arbeiten wurden in einer Sterilbank durchgeführt und ausschließlich sterile Medien, Lösungen und Geräte verwendet.

3.4.1 *Kulturbedingungen*

Die Kultivierung aller in der Arbeit verwendeten humanen Zelllinien erfolgte in horizontal gelagerten Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 %-igem CO₂/Luft-Gemisch und 95 %

Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage in frischem Kulturmedium 1:3-1:5 verdünnt, um optimale Wachstumsbedingungen zu ermöglichen. Bei der adhärennten Zelllinie HEK-293 wurde zunächst der Kulturüberstand abgenommen, die Zellschicht einmal mit 1x PBS (Fa. PAA, Pasching, A) gewaschen und durch Zugabe von 2 ml 1xTrypsin/EDTA (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) pro 100 cm² von der Zellkulturplatte gelöst. Anschließend wurden die Zellen in DMEM-Medium (mit L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose; Fa. PAA, Pasching, A) mit 10 % FCS (Fa. PAA, Pasching, A) und 1 % 100x Penicillin/Streptomycin (Fa. PAA, Pasching, A) resuspendiert und 1:5 verdünnt in eine frische Zellkulturplatte überführt. Die humane T-Zelllinie Jurkat wurde in RPMI-1640-Medium (Fa. PAA, Pasching, A) mit 10 % FCS, 1 % MEM non-essential amino acids (Fa. PAA, Pasching, A), 1 mM Natriumpyruvat (Fa. Invitrogen, Karlsruhe), 10 mM Hepes pH 7,3 (Fa. PAA, Pasching, A), 1 % 100x Penicillin/Streptomycin und 25 mM β -Mercaptoethanol kultiviert. Für frisch isolierte Blutzellen (mononukleäre Zellen, Granulozyten, T-Lymphozyten) wurde das RPMI-1640-Medium mit 3 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet.

3.4.2 *Langzeitlagerung von humanen Zelllinien*

Zur Langzeitlagerung wurden konfluente humane Zelllinien aus 25 ml Zelllösung 10 min bei 210 g zentrifugiert (Megafuge 2.0R; Fa. Heraeus Sepatech, Osterode) und in 2 ml kaltem FCS/10 % DMSO resuspendiert. Die Zelllösung wurde auf zwei Kryoröhrchen transferiert und diese in einer mit flüssigem Stickstoff befüllten Einfriermaschine (Nicoool LM10; Fa. Air Liquide DMC- CRYOPAL, Marne-la-Vallée Cedex, F) zunächst auf Stufe drei für 30 min und anschließend auf Stufe zehn für 10 min eingefroren. Die Zellen wurden bei -196 °C Flüssigstickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen durch vorsichtige Zugabe von 37 °C warmem Medium aufgetaut und mit 1x PBS gewaschen, um das restliche DMSO zu entfernen.

3.4.3 *Zellzahlbestimmung*

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde ein Aliquot einer Kulturlösung je nach Zelldichte mit Trypanblaulösung verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt, wobei intakte Zellen ungefärbt sind und tote oder beschädigte Zellen blau erscheinen.

3.4.4 *Transfektion von HEK-293-Zellen nach der Calciumphosphat-Methode*

Bei dieser Transfektionsmethode wird Calciumphosphat präzipitiert, das durch Zugabe von CaCl_2 zu Na_2HPO_4 entsteht und sich an die DNA anlagern kann. Dieser DNA-Calciumphosphat-Komplex wird von den Zellen durch Endozytose aufgenommen, wobei ein Teil der DNA anschließend in den Zellkern gelangt.

Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml in eine 6-Well-Schale ausgesät. Zur Herstellung der Transfektionslösung wurden 5 μg Plasmid-DNA mit H_2O auf 225 μl aufgefüllt, 25 μl 2,5 M CaCl_2 (Endkonzentration: 125 mM) hinzugegeben und unter Vortexen 250 μl 2x BBS-Lösung dazugetropft. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Transfektionslösung direkt auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 6 h in einem Brutschrank mit 5 %-igem CO_2 /Luft-Gemisch, 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, dann wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 h in 4 ml DMEM-Medium (+10 % FCS, +1 % 100x Penicillin/-Streptomycin) kultiviert.

2x BBS-Lösung (pH 6,95)

50 mM	N,N-Bis (2-hydroxyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES)
280 mM	NaCl
1,5 mM	Na_2HPO_4

3.4.5 *Isolierung von Zellen*

3.4.5.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gewonnen. Venöses Blut von gesunden Probanden wurde entnommen und in Plasmaröhrchen mit sprühgetrocknetem Natrium-Heparin (17 IU/ml) überführt. Das Blut wurde ggf. 1:1 mit 3 % Dextran T-500; 0,9 % NaCl vermischt und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sich die Erythrozyten-Aggregate sedimentiert hatten. Ein 50 ml-Röhrchen oder ein LeucoSep[®]-Röhrchen mit Filterscheibe (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen) wurden mit 12-15 ml Lymphozytentrennmedium LSM 1077 (Fa. PAA, Pasching, A) befüllt; anschließend wurde der Überstand des mit 3 % Dextran T-500; 0,9 % NaCl vermischte Blut oder unverdünntes Blut darüber geschichtet. Die nachfolgenden Schritte wurden nach den Angaben des LeucoSep[®]-Herstellers

durchgeführt. Das Pellet aus isolierten PBMC wurde in 10 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.4.5.2 Isolierung von naiven T-Zellen

Naive T-Zellen aus PBMC wurden mit Hilfe des Dynal® T Cell Negative Isolation Kit Ver II (Fa. Dynal Biotech ASA, Oslo, N) unter Depletion von B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Plättchen, dendritischen Zellen, Granulozyten und Erythrozyten nach Angaben des Herstellers isoliert. Das Dynal-System nutzt magnetisch markierte Antikörper zur gezielten Isolierung von Zellen. Der Vorteil einer negativen Depletion ist, dass isolierte Zellen nicht aktiviert werden.

3.4.5.3 Isolierung von Granulozyten

Zur Isolierung von Granulozyten wurde in einem 50 ml-Röhrchen je 12-15 ml Lymphozytentrennmedium LSM 1077 vorgelegt und vorsichtig mit 25 ml Überstand des mit 3 % Dextran T-500; 0,9 % NaCl vermischem Blut oder unverdünntem Blut (siehe 3.4.5.1) überschichtet. Nach 20 min Zentrifugation bei 1500 g (Megafuge 2.0R; Fa. Heraeus Sepatech, Osterode), 20 °C und ohne Bremse entstanden zwei Phasen, eine obere Serumphase und eine untere Phase mit dem Lymphozytentrennmedium. Diese wurden verworfen und das Pellet, das die Granulozyten und die Erythrozyten enthielt, einer Erythrozytenlyse unterzogen. Dazu wurde das Zellpellet in 10 ml kalter 0,2-%iger NaCl-Lösung resuspendiert, 30 sec inkubiert und anschließend die Isotonität durch die Zugabe von 10 ml kalter 1,6-%iger NaCl-Lösung hergestellt. Die isotone Zelllösung wurde bei 300 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand mit den Erythrozytenfragmenten verworfen und das Zellpellet so lange einer hypotonen Lyse unterzogen, bis das Pellet keine Rotfärbung mehr aufwies. Anschließend wurden die Granulozyten in 10 ml kaltem 1x PBS aufgenommen und bis zu ihrem Einsatz bei 4 °C gelagert.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 *Cytokin-Array*

Die Cytokinausschüttung stimulierter Granulozyten und T-Zellen wurde in den Kulturüberständen der Zellen mit Hilfe des ProteoPlex™ 16-Well Human Cytokine Array Kit (Fa. Novagen, Darmstadt) gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. In jedem Well sind Primärantikörper in Quadruplikaten gegen zwölf wichtige humane Cytokine

gespottet sowie Spots für Positiv- und Negativkontrollen, welche einen Vergleich von zehn Ansätzen ermöglichen. Die Spots der Positivkontrolle sind vom Hersteller nicht näher spezifiziert, die Negativkontrollen sind Spotting-Puffer-Spots.

Zellkulturüberstände von Granulozyten und T-Zellen wurden unverdünnt im ProteoPlex™ 16-Well Human Cytokine Array eingesetzt und weitere Arbeitsschritte nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.5.1.1 Stimulation von Granulozyten

Zunächst wurde eine 96-Well-Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit folgenden Antikörpern beschichtet:

- Ansatz 1: 5 µg anti-IgG₁, ad 100 µl Coatingpuffer
- Ansatz 2: 5 µg IL-8, ad 100 µl Coatingpuffer
- Ansatz 3: 2,5 µg DREG 55 und 2,5 µg DREG 200, ad 100 µl Coatingpuffer
- Ansatz 4: 5 µg IL-8, 2,5 µg DREG 55 und 2,5 µg DREG 200, ad 100 µl Coatingpuffer

Am nächsten Tag wurden die Wells zweimal mit 1x PBS gewaschen, bevor die Zellen dazugegeben wurden. Für die Stimulation wurden zu den mit Antikörpern bzw. IL-8 (Fa. Cell Concepts, Umkirch) beschichteten Wells 230 µl einer Granulozytensuspension ($8,3 \times 10^5$ Zellen in RPMI-1640-Medium + 3 % FCS + 1 % 100x Penicillin/Streptomycin) gegeben und die Zellen 5 Stunden bei 37 °C in 5 %-igem CO₂/Luft-Gemisch inkubiert. Die Granulozyten wurden nicht lysiert, sondern 5 min bei 300 g, und 4 °C zentrifugiert und die Überstände bis zu ihrer Verwendung im ProteoPlex™ 16-Well Human Cytokine Array bei -20 °C eingefroren.

3.5.1.2 Stimulation von T-Zellen

Zunächst wurde eine 96-Well-Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit folgenden Antikörpern beschichtet:

- Ansatz 1: 5 µg anti-IgG₁, ad 100 µl Coatingpuffer
- Ansatz 2: 5 µg anti-CD3, ad 100 µl Coatingpuffer
- Ansatz 3: 2,5 µg DREG 55 und 2,5 µg DREG 200, ad 100 µl Coatingpuffer
- Ansatz 4: 1,67 µg anti-CD3, 1,67 µg DREG 55, 1,67 µg DREG 200, ad 100 µl Coatingpuffer

Am nächsten Tag wurden die Wells zweimal mit 1x PBS gewaschen, bevor die Zellen dazugegeben wurden. In Antikörper beschichtete Wells wurden je 230 µl T-Zellsuspension ($1,45 \times 10^6$ Zellen in RPMI-1640-Medium + 3 % FCS + 1 % 100x Penicillin/Streptomycin) gegeben und 22 Stunden bei 37 °C, in 5 %-igem CO₂/Luft-Gemisch inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (300 g, 4 °C, 5 min) und die Überstände bis zu ihrer Analyse im ProteoPlex™ 16-Well Human Cytokine Array bei -20 °C eingefroren.

Coatingpuffer (pH 9,5):

100 mM	NaHCO ₃
33,6 mM	Na ₂ CO ₃

3.5.2 *Expression rekombinanter Proteine*

3.5.2.1 Expression von His- und GST-Fusionsproteinen in *Escherichia coli*

Für die Expression His- und GST-getaggtter Proteine wurden die mit den entsprechenden Plasmiden transformierten *E. coli*-Stämme BL21 (DE3), XL1 Blue, BL21 (DE3) CodonPlus-RIL, M15[pREP4] bzw. Rosetta (DE3)pLysS in 10-100 ml LB-Ampicillin- bzw. LB-Kanamycin-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 190 rpm (Aerotron; Fa. Infors AG, Bottmingen, CH) kultiviert. Diese Vorkultur wurde je nach gewünschter Proteinmenge in 0,5-6 l Medium (LB-Medium + Antibiotikum + 0,3-0,4 % Glucose) bis zu einer optischen Dichte von 0,1, gemessen bei 578 nm (OD₅₇₈), verdünnt und als Hauptkultur bei 37 °C und 190 rpm weiter inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ von 0,5-0,8 wurde die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) gestartet. Die Fusionsgene in den pET- bzw. pGEX-Vektoren sind unter der Kontrolle eines *lac*-Operators bzw. *tac*-Promotors und können in Anwesenheit von IPTG induziert werden. Nach der Induktion wurden die Kulturen für weitere zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Proteinpräparation geerntet (siehe 3.5.2.3 und 3.5.2.4).

Für die Überprüfung der Proteinexpression frisch klonierter Fusionsgene wurde eine Einzelkolonie transformierter *E. coli* von einer Selektionsplatte in 10 ml LB-Medium mit Antibiotikum sowie 34 µg/ml Chloramphenicol (Fa. Sigma aldrich, Saint Louis MO, USA) überimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 bei 37 °C und 190 rpm geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt wurden 1 ml der nicht induzierten Kultur als Kontrolle abgenommen, die Zellen pelletiert und in 100 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Der Rest der

Kultur wurde mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und für zwei Stunden bei 37 °C weiter geschüttelt. Anschließend wurden nochmals 1 ml von der Kultur abgenommen, die Zellen pelletiert und in 100 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch ein 5-minütiges Erhitzen bei 95 °C. Die Expression der induzierten und nicht induzierten Proben wurden mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung oder Western Blot überprüft. Für die SDS-PAGE wurden 15 µl Zelllysate eingesetzt.

3.5.2.2 Expression von His-Fusionsproteinen in *E. coli* unter osmotischem Stress

Bei der Proteinexpression unter osmotischem Stress werden die Bakterien zunächst in einem salzfreien Kulturmedium angezogen und anschließend zur Expressionsphase mit einer Endkonzentration von 4 % (w/v) NaCl und Zusätzen von organischen Osmolyten wie Glycerin, Sorbitol, Glycinbetain oder Hydroxyektoin kultiviert. Durch den Salzstress wird in den Bakterien eine Reihe von Stressantwortmechanismen induziert, die u. a. zur Bildung von Hitzeschockproteinen und Chaperonen führen (Barth et al., 2000). Diese unterstützen das rekombinante Protein während der Expression seine korrekte Faltung einzunehmen und üben einen positiven Einfluss auf dessen Stabilität und Löslichkeit aus. Durch die Anwesenheit von organischen Osmolyten, auch als kompatible Solute bezeichnet, wird die Salztoleranz von *E. coli* erhöht und das Wachstum unter Salzstress gewährleistet. Diese werden über den proP- und proU-Transportsystem von *E. coli* aufgenommen, gegen überschüssige Na⁺-Ionen ausgetauscht und wirken so zum Teil dem Schrumpfen der Zellen unter osmotischem Stress entgegen (Galinski, 1995). Darüber hinaus zeigen die kompatiblen Solute eine stabilisierende Wirkung auf ungefaltete oder denaturierende Proteine, indem sie durch die fehlende Interaktion mit Proteindomänen die Bildung von Hydratationsclustern verstärken (Blackwell und Horgan, 1991; Galinski, 1995).

Mit Plasmid transformierte Rosetta (DE3)pLysS bzw. BL21 (DE3) wurden in je 10 ml TB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 28-30 °C unter Schütteln bei 190 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde diese Vorkultur 1:30 in 100 ml TB-Medium mit Antibiotikum verdünnt und weiterhin bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 bei 28-30 °C und 190 rpm inkubiert. 500 µl der Kultur wurden abgenommen; der Rest wurde bei 3362 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml TB-Medium mit Antibiotikum, 4 % (w/v) NaCl, 0,5 M Sorbitol und 10 mM Betain (Endkonzentrationen) aufgenommen. In diesem Medium wurden die *E. coli*-Zellen 1 h bei 28-30 °C inkubiert; anschließend wurde die Proteinexpression mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM für 4 h induziert.

500 µl-Aliquots der induzierten und der nicht induzierten Kultur wurden sedimentiert und in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer gelöst. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend mittels SDS-PAGE untersucht.

3.5.2.3 Präparation von His-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Nach der Expressionsphase wurden die Zellen für 15 min bei 5855 g (Sorvall GSA Rotor; Fa. Thermo Scientific, Waltham MA, USA) bzw. 4000 rpm (Megafuge 2.0R; Fa. Heraeus Sepatech, Osterode) und 4 °C zentrifugiert und in 1/10-1/40 des ursprünglichen Kulturvolumens in Lysepuffer aufgenommen. Die Zellen für die Poly-L-Lysin-Affinitätschromatographie wurden in einem alternativen Lysepuffer resuspendiert (25 mM Tris/HCl pH 7,4; 10 % Glycerol; 4 mM EDTA; 14 mM β-Mercaptoethanol; 500 mM NaCl; 1 Tablette/50 ml Proteaseinhibitor Cocktail). Der Aufschluss erfolgte entweder durch Ultraschall (Branson Sonifier 250; Fa. Branson Ultraschall, Dietzenbach) bei 3 x 60 Puls, 50 % Output, 70 % Zyklen oder durch die Hochdruckdispersion (5 Passagen, 1500 bar; French Pressure Cell Press; Fa. Thermo Electron, Waltham MA, USA). Ab einem Expressionsvolumen von 1 l wurde die Hochdruckdispersion bevorzugt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 26892 g und 4 °C für 20 min (Sorvall SS34 Rotor; Fa. Thermo Scientific, Waltham MA, USA) sedimentiert und der Überstand (Rohextrakt) für die nachfolgende Affinitätschromatographie abgenommen.

Das 6xHis-Fusionsprotein wurde mittels IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) an NTA isoliert. 4 ml Ni-NTA-Agarose (50 %-ige Suspension; Fa. Qiagen, Hilden) pro Liter Expressionskultur wurden mit 10-fachem Bettvolumen Äquilierungspuffer gewaschen und mit dem Rohextrakt 1 h bei 4 °C in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Rohextrakt/Ni-NTA-Agarosegemisch in eine Econo-Pac Säule (Fa. BioRad, München) überführt und das Säulenmaterial mit dem 10-30-fachen Bettvolumen Waschpuffer I gewaschen. Die Säule wurde ggf. mit dem 4-10-fachen Bettvolumen Waschpuffer II gewaschen und das 6xHis-Fusionsprotein mit 5-10 Säulenvolumen Elutionspuffer von der Säule eluiert, wobei das Eluat in 1-2 ml-Fraktionen gesammelt wurde.

Lysepuffer (pH 8,0):

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
150-450 mM	NaCl
ggf. 10 % (v/v)	Glycerin
ggf. 3 mM	β -Mercaptoethanol
ggf. 0,1-0,2 mM	PMSF
ggf. 1 % (v/v)	Triton X-100
1 Tablette/50 ml	Complete Proteaseinhibitor Cocktail
ggf. 100 μ g/ml	Lysozym

Äquilibrierungs- und Waschpuffer I (pH 8,0):

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
150-450 mM	NaCl
ggf. 10 % (v/v)	Glycerin
ggf. 3 mM	β -Mercaptoethanol
ggf. 10 mM	Imidazol

Waschpuffer II (pH 8,0):

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
150-450 mM	NaCl
ggf. 10 % (v/v)	Glycerin
ggf. 3 mM	β -Mercaptoethanol
10-40 mM	Imidazol

Elutionspuffer (pH 8,0):

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
150-450 mM	NaCl
ggf. 10 % (v/v)	Glycerin
ggf. 3 mM	β -Mercaptoethanol
250 mM	Imidazol

Für die Reinigung von 6xHis-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde das Bakterienpellet in 1/25-Volumen der Expressionskultur in Harnstoff-Lysepuffer aufgenommen und in einem Über-Kopf-Schüttler bei 4 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Lysat bei 26892 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und der Überstand auf die äquilibrierte Ni-NTA-Agarose gegeben. Die Reinigungsprozedur erfolgte gemäß der Reinigung unter nativen Bedingungen (s. o.) unter Einsatz von Harnstoff-Lysepuffer, Harnstoff-Waschpuffer und Harnstoff-Elutionspuffer.

Harnstoff-Lysepuffer (pH 8,0):

10 mM	Tris/HCl
100 mM	NaH_2PO_4
8 M	Harnstoff

Harnstoff-Äquilibrierungs- und Waschpuffer (pH 6,3):

10 mM	Tris/HCl
100 mM	NaH_2PO_4
8 M	Harnstoff

Harnstoff-Elutionspuffer (pH 4,5):

10 mM	Tris/HCl
100 mM	NaH_2PO_4
8 M	Harnstoff

Um die Proteinkonzentration der Eluate abzuschätzen, wurden jeweils 2 µl im NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer eingesetzt und bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Die Eluate ab einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml wurden vereinigt und entsalzt. 5-10 µl jeder Reinigungsfraction wurden mit 4x SDS-Probenpuffer (siehe 3.5.10) vermischt, 5 min bei 95 °C denaturiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

3.5.2.4 Präparation von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Transformierte *E. coli* wurden 2 h nach Induktion wie unter 3.5.2.3 beschrieben geerntet und aufgeschlossen. GST-Fusionsproteine wurden über eine Glutathion-Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurden pro Liter Expressionskultur 2 ml Glutathion-Sepharose 4B (50 % Suspension; Fa. GE Healthcare, München) in eine Econo-Pac Säule (Fa. BioRad, München) gegeben und mit 10-fachem Bettvolumen Äquilibrationpuffer gewaschen. Dann wurde der Rohextrakt auf die Säule aufgetragen. Der Durchlauf wurde aufgefangen und zwei weitere Male über die Matrix gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit dem 20-25 Bettvolumen Waschpuffer wurde das an die Säulenmatrix gebundene Fusionsprotein mit dem 10-fachen Säulenvolumen reduzierter Glutathionlösung (siehe Elutionspuffer) von der Säule eluiert. Das Fusionsprotein wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt und die OD im NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer bei 280 nm gemessen. Die Eluatfractionen ab einer OD von 0,5 mg/ml wurden ggf. vereinigt und durch eine Dialyse entsalzt. Die Reinheit der einzelnen Fractionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

Lysepuffer (pH 8,0):

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
150-300 mM	NaCl
10 % (v/v)	Glycerin
0,2 mM	PMSF

Äquilibrierungs- und Waschpuffer (pH 8,0):

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
150-300 mM	NaCl
10 % (v/v)	Glycerin

Elutionspuffer (pH 8,0):

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
150-300 mM	NaCl
20 mM	reduziertes Glutathion

3.5.2.5 Abspaltung von His- und GST-tags mittels Thrombin

Für Kristallisationsversuche wurden die 6xHis- und die GST-tags der Fusionsproteine proteolytisch entfernt. Die verwendeten Vektoren enthielten Sequenzen, die für eine Thrombinschnittstelle kodieren.

Zu den entsalzten 6xHis- und GST-Fusionsproteinen wurde Thrombin (Fa. Calbiochem, Darmstadt) in einer Konzentration von 1 U pro Milligramm Protein zugegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Ni-NTA- bzw. Glutathion-Beads für 30 min bei Raumtemperatur in einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert, um den 6xHis- bzw. den GST-tag zu entfernen. Der Überstand mit dem gewünschten Protein wurde abgenommen und das Thrombin ggf. mit PMSF in einer Endkonzentration von 200 µM inaktiviert. Zur Überprüfung der Spaltung wurden die Verdauansätze über SDS-PAGE aufgetrennt.

3.5.3 *Herstellung von Gesamtzelllysaten aus Jurkat- und HEK-293-Zellen*

$1\text{-}3 \times 10^7$ Jurkatzellen wurden 3 min bei Raumtemperatur und 300 g zentrifugiert und dann mit Jurkat-Medium (siehe 3.4.1) gewaschen. Die Zellpellets wurden in 1 ml-Jurkat-Medium aufgenommen und die Zellen anschließend ggf. 5 min mit 5 µg/ml Antikörper oder 3 min mit 100 ng/ml PMA stimuliert. Bei diesen Versuchen wurden nicht-stimulierte Zellen parallel als Kontrollen mitgeführt. Die Zellen wurden nach Stimulation für 10 sec bei 10 000 g und 4 °C sedimentiert und die Pellets in 1 ml 1x TBS mit 1 % NP-40 aufgenommen. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die nicht gelösten Zellbestandteile bei 20 000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert.

Transfizierte HEK-293-Zellen wurden nach 48 h von ihrem Kulturmedium befreit, abgeschabt und in 5 ml 1x TBS aufgenommen. Die Zellen wurden 10 min bei 300 g zentrifugiert und anschließend in Lysepuffer (1x TBS; 0,5 % Triton X-100; 1/50 Volumen Complete Proteaseinhibitor Cocktail) resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die nicht gelösten Zellbestandteile bei 20 000 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert.

Zur Analyse wurde ein Aliquot vom Überstand der Proben abgenommen und mit 4x Probenpuffer vermischt. Nach der Inkubation für 5 min bei 95 °C wurden 10 µl für SDS-PAGE eingesetzt und anschließend eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Die restlichen Überstände wurden für verschiedene Experimente verwendet.

1x TBS:

50 mM	Tris/HCl pH 7,5
150 mM	NaCl

3.5.4 *In vitro*-Bindungsassay (GST-Pull-Down-Assay)

GST-Fusionsproteine wurden an GSH-Sepharose-Beads gekoppelt und anschließend mit potentiellen Bindungspartnern bzw. Zelllysats inkubiert. Pro Ansatz wurden 5 µg GST-Fusionsprotein oder GST als Kontrolle mit 20 µl 1x TBS gewaschenen GSH-Sepharose-Beads in einem Über-Kopf-Schüttler bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert und dann mit 1x TBS gewaschen. Anschließend wurden 5 µg des zu untersuchenden Proteins bzw. Proteinlysats aus $1-3 \times 10^7$ Jurkatzellen zu den Beads gegeben und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 1x TBS-T wurden die GST-Fusionsproteine sowie die mit ihnen assoziierten Proteine von den Beads durch ein 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C in 20 µl 1x SDS-Probenpuffer eluiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

1x TBS-T:

50 mM	Tris/HCl pH 7,5
150 mM	NaCl
0,2 % (v/v)	Tween 20

3.5.5 *Analyse von Proteinen mittels Massenspektrometrie*

Die massenspektrometrische Analyse der Proteine im MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight*) wurde in Kooperation mit Dr. Christoph Weise (AG Mulhaupt) am Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin durchgeführt wie bei Kasheverov et al. (1998) beschrieben.

3.5.6 *Phosphatase-Assay*

Zur Bestimmung der Phosphataseaktivität von PP2A im 96-Well-Format wurde ein Malachitgrün-Ammoniummolybdat basiertes Assaysystem verwendet, bei dem die Phosphataseaktivität über das frei werdende Phosphat ermittelt wird. Die Methode basiert auf Bildung eines farbigen Malachit-Molybdatphosphat-Komplexes, der durch Zugabe von Ammoniummolybdatlösung bei Anwesenheit von freiem Phosphat entsteht, und dessen Farbintensität bei 620-650 nm im Spektralphotometer gemessen werden kann. Mittels einer Eichkurve kann dann die Menge an freiem Phosphat rückberechnet werden.

Alle Dephosphorylierungsreaktionen wurden durch Zugabe von je 100 µl Biomol Green Reagenz (Fa. Biomol, Hamburg) gestoppt. Bei Phosphatfreisetzung wird das zunächst gelbe Reagenz innerhalb von 30 min bei Raumtemperatur grün. Die Intensität der Grünfärbung, die somit proportional zur Phosphatfreisetzung ist, wurde im Mikroplatten-Spektralphotometer Spectra Max 340 PC (Fa. Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) bei 620-650 nm gemessen. Als Negativkontrolle fungierten Ansätze ohne PP2A oder mit dem nichtphosphorylierten Peptid Bio-LScyto WT (Bio-bA-RRLKKGKKSKRS-MNDPY). Für die Erstellung einer Eichkurve wurde der mitgelieferte Phosphatstandard in einer Konzentration zwischen 0 und 2000 pmol verwendet.

Zur Messung der PP2A-Aktivität wurden in einem 50 µl-Ansatz mit je 10 µg LScyto-Peptid (Bio-LScyto WT, Bio-LScyto P364, Bio-LScyto P367 bzw. Bio-LScyto P364+P367) aufgefüllt mit 1x Phosphatasepuffer I und die Dephosphorylierung durch Zusatz von 0,05 U PP2A (10 U= 5 µg protein; Fa. Millipore, Schwalbach) gestartet. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Biomol Green Reagenz gestoppt. Als Negativkontrolle diente der Ansatz mit nicht phosphoryliertem LScyto (Bio-LScyto WT); diese wurde von allen Werten abgezogen.

Zur Inhibition der PP2A-Aktivität wurde in einem 50 µl-Ansatz 0,031 U PP2A mit 30 µM PhapII WT, PhapII S9E bzw. PhapII S9A oder verschiedene Konzentrationen von Bio-LScyto WT, aufgefüllt mit 1x Phosphatasepuffer II, 10 min bei RT vorinkubiert und anschließend die Dephosphorylierung durch Zusatz von 5 µg Bio-LScyto P364+P367 gestartet. Nach 45 min Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Biomol Green Reagenz gestoppt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne PP2A; diese wurde von allen Werten abgezogen.

Für die Bestimmung der Dephosphorylierung von LScyto durch PP2A im zellulären Kontext und deren Inhibition durch verschiedene Phosphataseinhibitoren wurden 2×10^6 Jurkat T-Zellen mit 20 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl gewaschen, in 20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 % NP-40 lysiert und 10 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Zur Befreiung von zellulärem Phosphat wurden die Überstände auf DyeEx Gelfiltrations-Spinsäulen (Qiagen, Hilden, Germany) geladen und 3 min bei 770 g zentrifugiert. Anschließend wurden pro Ansatz 3 µl vom Überstand der Jurkat T-Zelllysate als Proteinphosphatasequelle mit verschiedenen Konzentrationen an Phosphataseinhibitoren wie okadaische Säure (Fa. Enzo Life Sciences, Lörrach) oder NIPP-1 (Fa. Merck, Darmstadt) in 1x Phosphatasepuffer I 10 min bei RT vorinkubiert und anschließend die Dephosphorylierung durch Zusatz von 15 µg 2-fach phosphoryliertem LScyto-Peptid

(Bio-LScyto P364+P367) gestartet. Nach 45 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Biomol Green Reagenz gestoppt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne PP2A; diese wurde von allen Werten abgezogen.

1x Phosphatasepuffer I

50 mM	Tris/HCl pH 7,0
1 mM	MnCl ₂
1 mM	MgCl ₂
1 mM	CaCl ₂

1x Phosphatasepuffer II

50 mM	Tris/HCl pH 7,4
1 mM	MnCl ₂
1 mM	MgCl ₂
1 mM	CaCl ₂

Phosphopeptide

Bio-LScyto P364	Bio-bA-RRLKKGKKS(PO ₃)KRSMNDPY
Bio-LScyto P367:	Bio-bA-RRLKKGKKS(PO ₃)MNDPY
Bio-LScyto P364+P367	Bio-bA-RRLKKGKKS(PO ₃)KRS(PO ₃)MNDPY

3.5.7 Oberflächenplasmonresonanz („BIAcore“)

Interaktionen von PhapII-Varianten mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz im BIAcore X-System (Fa. GE Healthcare, Freiburg) untersucht. Die Messungen wurden in Laufpuffer (siehe unten) bei 25 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min durchgeführt. Vor der Immobilisierung von biotinyliertem LScyto-Peptid (Bio-LScyto: Bio-bA-RRLKKGKKS(PO₃)KRSMNDPY) als Ligand wurde ein mit Streptavidin vorbeschichteter Sensor Chip (Sensor Chip SA; Fa. GE Healthcare, Freiburg) durch drei aufeinanderfolgende Injektionen mit 100 µl Regenerationslösung bei einer Fließgeschwindigkeit von 100 µl/min äquilibriert. Anschließend wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min auf einer der zwei Spuren des Sensor Chips Bio-LScyto bis zu einem *Baseline Shift* von ~265 *Resonance Units* (RU) immobilisiert. Die zweite Spur des Sensor Chips (Kontrollspur) wurde mit dem LScyto-Peptid mit permutierter Aminosäuresequenz (Bio-SVC) bis zu einem *Baseline Shift* von ~316 RU immobilisiert. Anschließend folgten drei Injektionen mit Regenerationslösung, um restliche, ungebundene biotinylierte Peptide zu entfernen.

Zur Messung einer möglichen Interaktion wurden 100 µl einer gereinigten Proteinlösung von PhapII in einer Konzentration von 40 nM oder 250 nM als Analyt über den Chip gegeben. Die Assoziationszeit betrug 200 sec. Nach einer 180 sec Dissoziationszeit wurde die Oberfläche des Sensor Chips 1 min mit Regenerationslösung gespült, um bei der nächsten Folgemessung gleiche Ausgangsbedingungen zu haben. Die Bindungsereignisse wurden mit Hilfe der BIAcore X Control Software (Fa. BIAcore, Freiburg) detektiert und

in einem sog. Sensorgramm in Echtzeit visualisiert, das in *Resonance Units* (RU) pro Zeit angegeben wird. Unspezifische Interaktionen mit der Chipoberfläche (siehe Kontrollspur) aufgrund von entgegengesetzten Ladungen beider Proteine wurden während der Messung sofort von der Spur mit LScyto-Peptid abgezogen.

Für die Ermittlung kinetischer Daten wurden fünf verschiedene Konzentrationen (250 pM-1 μ M) von PhapII-Varianten eingesetzt, wobei einer der Konzentrationen doppelt gemessen wurde. Der Laufpuffer ohne PhapII wurde als negative Referenz und wurde bei der Auswertung von allen Bindungskurven abgezogen. Die Messungen erfolgten bei einer Fließgeschwindigkeit von 30 μ l/min. Eine Einzelmessung bestand aus einer 200 sec Assoziationsphase und einer 360 sec Dissoziationsphase. Die Datenanalyse und die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D als Maß für die Affinität sowie der kinetischen Parameter k_a (Assoziationsrate) und k_d (Dissoziationsrate) erfolgten mit Hilfe des Programms BIAevaluation 3.0 (Fa. GE Healthcare, Freiburg) unter Annahme eines stöchiometrischen Bindungsverhältnisses von 1:1 (Langmuir-Bindung) mit der Besonderheit einer *Drifting Baseline*.

Für den Nachweis der Interaktion von PP2A mit LScyto wurde wie oben für PhapII beschrieben, Bio-LScyto auf die erste Spur eines Sensor SA Chips bis zu einem *Baseline Shift* von \sim 488 RU immobilisiert. Die zweite Spur diente als Referenzspur für unspezifische Wechselwirkungen mit der Chipoberfläche und blieb daher unbehandelt. Zur Messung einer möglichen Interaktion wurden 100 μ l PP2A (Fa. Millipore, Schwalbach) in einer Enzymkonzentration von 0,031 U eingesetzt. Diese Konzentration entsprach der PP2A-Konzentration im Malachitgrün-basierten Phosphataseassay und sollte den Bindungsbedingungen im Assayansatz imitieren. Eine Einzelmessung bestand aus einer 200 sec Assoziationsphase und einer 180 sec Dissoziationsphase. Alle nachfolgenden Schritte zur Regeneration des Chips und Auswertung der Bindungskurven entsprachen wie oben für PhapII beschrieben.

Laufpuffer:

20 mM	Tris/HCl pH 7,5
250 mM	NaCl
0,2 % (v/v)	Brij-58
2 mM	CaCl ₂

Regenerationslösung:

1 M	NaCl
50 mM	NaOH

3.5.8 *Proteinbestimmung mittels BCA (Bicinchoninic acid)*

Für die Verwendung in Mikrotiterplatten wurden wie vom Hersteller angegeben 50 Anteile BCATM Reagenz A mit einem Anteil von BCATM Reagenz B (Fa. PIERCE, Rockford IL, USA) gemischt. Pro Messung wurden dann 200 µl der Mischung zu 25 µl der vorgelegten BSA-Standards (25-2000 µg/ml) und verdünnten Proteinproben gegeben, gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die gebildeten Chelatkomplexe absorbieren Licht bei 562 nm, das im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer Spectra Max 340 PC gemessen werden konnte. Der Proteingehalt von unbekannten Proteinproben konnte mit Hilfe der Eichgerade berechnet werden.

3.5.9 *Entsalzung und Konzentrierung von Proteinlösungen*

Proteinlösungen wurden entsalzt, indem sie gegen 1 l 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl bei 4 °C unter ständigen Rühren für 1 h dialysiert wurden (Dialyseschlauch, ZelluTrans, Ausschluss MW: 12-14 kDa, Flachbreite: 33 mm, Wandstärke: 23 µM, Ø 21 mm; Fa. Roth, Karlsruhe). Anschließend wurde der Puffer gewechselt und die Dialyse über Nacht fortgesetzt.

Alternativ wurden Proteinlösungen mit Hilfe von Amicon ultra Konzentratoren (Ausschluss: 5000 MW; Fa. Millipore, Schwalbach) entsalzt und konzentriert.

3.5.10 *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Für die Auftrennung von Proteinen mit einer molaren Masse von 15-100 kDa wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dazu wurden vertikale Gele von 0,75 mm Dicke und je nach Proteingröße mit 10, 12 bzw. 15 %-igem (w/v) Trenngel verwendet, das mit 4,5 %-igem (w/v) Sammelgel überschichtet wurde. Zur Ausbildung der Probenaschen wurden 10- oder 15-zahnige Kämme in das frisch gegossene Sammelgel eingesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95 °C gekocht und anschließend in die Taschen gefüllt. Als Proteinmarker wurden PageRuler Prestained Protein Ladder (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) oder PageRuler Unstained Protein Ladder (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Proteintrennung wurde in einer mit SDS-Laufpuffer befüllten Mini-PROTEAN II Elektrophoresekammer (Fa. BioRad, München) zunächst bei einer konstanten Spannung von 80-90 V (Sammelgellauf) und anschließend bei einer konstanten Spannung von 180-200 V (Trenngellauf) durchgeführt. Die Gele wurden im Anschluss gefärbt oder einer Western Blot-Analyse unterzogen.

Tab. 9: Zusammensetzung der Tris-Glycin-SDS-PAA-Gele.

4,5 % Sammelgel		Trenngel	10 %	12 %	15 %
H ₂ O	1,2 ml	H ₂ O	3,3 ml	2,8 ml	2,0 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	0,5 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
30 % Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung (37,5:1)	0,3 ml	30 % Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung (37,5:1)	2,7 ml	3,2 ml	4,0 ml
10 % SDS (w/v)	20 µl	10 % SDS (w/v)	80 µl	80 µl	80 µl
10 % APS (w/v)	8 µl	10 % APS (w/v)	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	1,5 µl	TEMED	6 µl	6 µl	6 µl

4x SDS-Probenpuffer:

80 mM	Tris/HCl pH 6,8
10 % (v/v)	Glycerin
2 % (w/v)	SDS
2 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,005 % (w/v)	Bromphenolblau

1x SDS-Laufpuffer (pH 8,8):

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1 (w/v)%	SDS

3.5.11 Coomassie-Blaufärbung

Die Coomassielösung wurde nach Sambrook et al. (1989) hergestellt. Zur Visualisierung von Proteinen nach der SDS-PAGE wurden die Gele für 2 h oder über Nacht in der Färbelösung gefärbt, zum Entfärben des Hintergrundes in der Entfärbelösung mehrere Stunden inkubiert, kurz in H₂O eingelegt und zur Dokumentation eingescannt. Anschließend wurden die Gele bei 70 °C für 1 h getrocknet (Gel Dryer Model 583; Fa. BioRad, München).

Coomassie-Färbelösung:

0,25 % (w/v)	Coomassie R-250
50 % (v/v)	Methanol
5 % (v/v)	Essigsäure

Entfärbelösung:

20 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure

3.5.12 Silberfärbung

Zur Visualisierung von Proteinen zwischen 0,1 ng und 1 ng pro Bande wurden die SDS-Polyacrylamidgele nach der Elektrophorese für 20 min in der Fixierlösung I inkubiert. Anschließend wurden die Gele für 25 min oder über Nacht in die Fixierlösung II gelegt, nach dreimaligem Waschen für je 10 min in H₂O in der Färbelösung für 40 min gefärbt und nach 2-3-maligem Schwenken in H₂O die Entwicklerlösung zugegeben. Sobald die gewünschte Färbung erzielt war, wurde der Entwicklungsprozess mit 50 mM EDTA-Lösung gestoppt. Anschließend wurde die Lösung verworfen und die Gele wurden bis zur Dokumentation in H₂O belassen.

Fixierlösung I:

50 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Eisessig

Fixierlösung II:

30 % (v/v)	Ethanol
0,5 M	Na-Acetat x 3H ₂ O
0,5 % (v/v)	Glutaraldehyd (frisch zugegeben)
0,2 % (v/v)	Na-Thiosulfat x 5H ₂ O (frisch zugegeben)

Färbelösung (frisch angesetzt):

0,1 % (w/v)	Silbernitrat
0,01 % (w/v)	Formaldehyd

Entwicklerlösung (pH 11,2):

2,5 % (w/v)	Natriumcarbonat
0,01 % (w/v)	Formaldehyd (frisch zugegeben)

Stopplösung (pH 8,0):

50 mM	EDTA
-------	------

3.5.13 Chromatographische Trennverfahren

3.5.13.1 Poly-L-Lysin-Agarose-Chromatographie

Poly-L-Lysin ist ein kationisches Polymer, das DNA, Membranen von Erythrozyten und negativ geladene Proteine binden kann (Belmonte et al., 1987; Jacobson und Branton, 1977; Ramasamy et al., 2007).

Für die Chromatographie wurde an Agarose gebundenes Poly-L-Lysin (MG: 4000-15000; Fa. Sigma aldrich, Saint Louis MO, USA) verwendet und dieses in eine XK 16/20 Säule (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) überführt. Die Säulenmatrix wurde mit dem 5-6-fachen Bettvolumen Puffer B äquilibriert.

Der Überstand (Rohextrakt) von lysierten Bakterienzellen, hergestellt nach dem Protokoll für His-Fusionsproteine aus E. coli (siehe 3.5.2.1 und 3.5.2.3), wurde 1:5 mit Laufpuffer verdünnt und auf die Poly-L-Lysin-Säule aufgetragen. Die Säule war an eine

Peristaltikpumpe (P1; Fa. Pharmacia Biotech, Stockholm, S) angeschlossen und eine Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min eingestellt. Der Lauf wurde bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Säule mit dem 6-fachen Bettvolumen Laufpuffer gewaschen und dann die gebundenen Proteine mit einem NaCl-Stufengradienten (0,6; 0,7; 0,8; 0,9 und 1 M) von der Säule eluiert. Die Absorption des Eluats bei 280 nm wurde mit dem Photometer UVICORD 2138 S (Fa. Pharmacia Biotech, Stockholm, S) kontinuierlich aufgezeichnet (Photometerschreiber; Fa. Kipp & Zonen, XH Delft, NL).

Äquilibrierungs- und Laufpuffer:

25 mM	Tris/HCl pH 7,4
10 % (v/v)	Glycerin
1 mM	EDTA
14 mM	β-Mercaptoethanol
500 mM	NaCl

3.5.13.2 Anionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung eines Proteins mit einer entgegengesetzt geladenen Matrix (Jungbauer und Hahn, 2009). Man unterscheidet zwischen Anionenaustauscher, die positiv geladene Gruppen an der Matrix tragen, und Kationenaustauscher, an dessen Matrix negativ geladene Gruppen immobilisiert sind. Die Wechselwirkung des Proteins mit der Matrix kann mit Hilfe eines Salz- oder pH-Gradienten aufgehoben, die gebundenen Proteine somit eluiert werden. HiTrap Q-Sepharose Fast Flow (QFF; Fa. GE Healthcare, Freiburg) ist ein starker Anionenaustauscher, dessen Ionenaustauschergruppe aus einer quartären Aminogruppe besteht. Für die Chromatographie wurde eine 1 ml-QFF-Säule an eine Niederdruckanlage (ÄktaTMFPLCTM; Fa. Amersham Biosciences, Freiburg), die sich in einer Kühlkammer (Schott Termofrost AB; Fa. Schott, Arvika, S) befand, angeschlossen und mit fünf Säulenvolumen partikelfreiem Puffer A (20 mM Hepes pH 7,0; 150 mM NaCl) äquilibriert. Die Proteinlösung wurde ein Mal über die Säule gegeben und die Säule bei 4 °C mit 40 Säulenvolumen Puffer A gewaschen, um schwach gebundene Proteine von der Säule zu entfernen. Anschließend wurde das gebundene Protein mit einem Gradienten von 0,15 M bis 1 M NaCl mit einem Volumen des 15-fachen Säulenvolumens eluiert; 1 ml-Fractionen wurden gesammelt. Die Elution des Proteins wurde mit Hilfe des Programms UNICORNTMv5.01 (Fa. GE Healthcare, Freiburg) am Computer verfolgt und analysiert. Alternativ wurden weitere partikelfreie Niedrig- und Hochsalzpuffer eingesetzt:

- 50 mM Tris/HCl pH 8,0 und 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 M NaCl
- 20 mM Tris/HCl pH 8,0 und 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 M NaCl

3.5.13.3 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie, auch Größenausschlusschromatographie genannt, ermöglicht die Trennung von Proteinen entsprechend ihrer molaren Masse, Oligomerisierungsgrad und Form.

Gelfiltration an Superdex-Säulen

Für die chromatographische Trennung von Proteinen wurde eine entsprechende Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade, 120 ml Säulenvolumen; HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade, 320 ml Säulenvolumen und HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, 320 ml Säulenvolumen; Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) an die Niederdruckanlage in einer Kühlkammer (siehe 3.5.13.2) angeschlossen und mit einem Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert. Nach Auftragen der partikelfreien Proteinlösung wurden die ersten durch die Säule gepumpten Fraktionen im Umfang von 0,3-0,33 Säulenvolumen verworfen, bevor 1 ml-Fraktionen bis zu einer konstant niedrigen UV-Absorption nahe dem Nullwert gesammelt wurden. Der Lauf wurde bei 4 °C und einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Anschließend wurde die Säule mit einem Säulenvolumen Laufpuffer nachgespült. Die molare Masse bzw. der Oligomerisierungszustand der eluierten Proteine von der HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade Säule konnten durch Vergleich mit der jeweils verwendeten Säule erstellten Kalibrierung mit Standardproteinen (Gel Filtration Molecular Weight Markers 29-669 kDa; Fa. Sigma aldrich, Saint Louis MO, USA) abgeschätzt werden. Es wurden verschiedene partikelfreie Äquilibrierungs-/Laufpuffer verwendet:

Gelfiltration an Superdex 75 16/60

Äquilibrierungs- und Laufpuffer:

<i>Puffer 1</i>	<i>Puffer 2</i>	<i>Puffer 3</i>	<i>Puffer 4</i>
20 mM Tris/HCl pH 8	50 mM Tris/HCl pH 8	50 mM Tris/HCl pH 8	50 mM Tris/HCl pH 8
150 mM NaCl	150 mM NaCl	300 mM NaCl	150 mM NaCl
			2 mM CaCl ₂

*Gelfiltration an Superdex 75 26/60***Äquilibrierungs- und Laufpuffer:**

<i>Puffer 1</i>	<i>Puffer 2</i>	<i>Puffer 3</i>	<i>Puffer 4</i>
20 mM Hepes pH 7	20 mM Tris/HCl pH 8	50 mM Tris/HCl pH 8	50 mM Tris/HCl pH 8
150 mM NaCl			150 mM NaCl

*Gelfiltration an Superdex 200 26/60***Äquilibrierungs- und Laufpuffer:**

<i>Puffer 1</i>	<i>Puffer 2</i>
50 mM Tris/HCl pH 8	50 mM Tris/HCl pH 8
150 mM NaCl	

Gelfiltration an Sephacryl S 200 26/100

Sephacryl S 200 High Resolution (Fa. GE Healthcare, Freiburg) ist eine Gelfiltrationsmatrix zur Trennung von Antikörpern, Serumproteinen und Proteinen einer mittleren Größe (5-250 kDa). 750 ml Säulenmaterial wurden nach Angaben des Herstellers in eine XK 26/100 Säule (Fa. GE Healthcare, Freiburg) gepackt, an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und mit zwei Bettvolumen partikelfreiem Puffer äquilibriert. Proteinlösungen wurden durch Zentrifugation von Partikeln befreit und luftblasenfrei auf die Sephacryl S 200 26/100-Säule aufgetragen. Danach wurde Laufpuffer mit einer Flussrate von 2 ml/min durch die Säule gepumpt. Der Proteingehalt des Eluats wurde als Absorption bei 280 nm photometrisch gemessen und registriert. Proteinhaltige Fraktionen mit einem distinkten Peak wurden gesammelt.

Äquilibrierungs- und Laufpuffer:

25 mM	Tris/HCl pH 7,4
10 % (v/v)	Glycerin
1 mM	EDTA
500 mM	NaCl
0,01 % (v/v)	Brij-35

3.5.13.4 LScyto-Affinitätschromatographie

3 mg GST-LScyto-Fusionsprotein wurden an 600 µl GSH-Sepharose im Batch-Verfahren in 1x TBS bei 4 °C und über Nacht gekoppelt; das Säulenmaterial wurde mit 1x TBS gewaschen und anschließend auf eine Econo-Pac Säule übertragen. PhapII-Protein wurde auf die Säule gegeben, mit 10 Säulenvolumen 1x TBS gewaschen und mit einem NaCl-

Gradienten (0,35; 0,45; 0,55 und 1,15 M) eluiert. 2 ml-Eluatfraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 *Western Blot-Analyse*

Für die immunochemische Detektion wurden die Proteine nach der SDS-PAGE auf eine Hybond-P PVDF-Membran (0,45 µm; Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) oder bei Proteinen mit einer molaren Masse unter 10 kDa auf eine Immobilon-P^{SQ} PVDF-Membran (0,2 µm; Fa. Millipore, Schwalbach) im Nassblotverfahren (Mini Trans-Blot, Fa. BioRad, München) bei 4 °C und konstanter Stromstärke von 250 mA für 1 h transferiert. Der Transfer wurde durch Inkubation der Membran für einige Minuten in der Ponceau S-Färbelösung überprüft. Die Proteine auf der kleinporigen Membran wurden 10 min in einer 0,25 %-igen Glutaraldehydlösung fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung durch ein dreimaliges Waschen je 5 min in der 1x TBS-T-Lösung (s. o.) entfernt. Alle Membranen wurden für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x TBS-T-Lösung inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren. Die nachfolgenden Inkubationsschritte mit den Primär- und den Sekundärantikörpern und die anschließenden Waschschrte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte mit Hilfe der *Enhanced* Chemoluminiszenz-Lösung (ECL). Die Membran wurde 2 min in der Lösung inkubiert, Reste der Lösung wurden entfernt und die Membran in eine Röntgenfilm-Kassette (Fa. Rego X-Ray, Augsburg) eingelegt. In einer Dunkelkammer wurde auf die Membran ein *High Performance Chemiluminescence* Film (Fa. GE Healthcare, München) gelegt, je nach Signalstärke zwischen 10 sec und 16 h (ÜN) exponiert und anschließend in einer Entwicklermaschine (Optimax Typ TR; Fa. MS Laborgeräte, Dielheim) entwickelt.

Transferpuffer:

25 mM	Tris Base
192 mM	Glycin

Ponceau S Färbelösung

0,2 % (w/v)	Ponceau S
3 % (v/v)	Essigsäure

ECL-Lösung:

Lösung A (Lagerung bei 4 °C): 100 mM Tris/HCl pH 8,6 und 4 mg/ml Luminol

Lösung B (Lagerung bei RT, dunkel): 1,1 mg/ml Hydroxycoumarinsäure in DMSO

Einsatz: 2 ml Lösung A

200 µl Lösung B

0,6 µl 30 % H₂O₂

3.6.1.1 Entfernung von Proteinkomplexen von PVDF-Membranen („Stripping“)

Bei vergleichenden Analysen wurden PVDF-Membranen, auf die Proteine geblottet worden waren, zum Nachweis unterschiedlicher Proteine sequenziell mit mehreren unterschiedlichen primären Antikörpern inkubiert. Als Zwischenschritt wurden die primären und sekundären Antikörper der vorherigen Inkubation von der Membran durch Inkubation in der Denaturierungslösung (30 min, 50 °C, unter Schütteln) abgewaschen. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 1x TBS-T je 10 min gespült und in Blockierlösung gelegt. Die nächsten Schritte entsprachen dem Protokoll der Western Blot-Analyse.

Denaturierungslösung:

62,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
100 mM	β-Mercaptoethanol
2 % (w/v)	SDS

3.6.2 *Durchflusszytometrie*

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode, mit der spezifische Oberflächenmarker von Zellen mittels Fluoreszenz-markierter (PE, FITC etc.) Antikörper nachgewiesen werden können, aber auch, nach entsprechender Permeabilisierung der Zellen, für den Nachweis von intrazellulären Proteinen Verwendung finden.

Für die Messung im Durchflusszytometer wurden pro Ansatz $0,5\text{--}1 \times 10^6$ Zellen zunächst in 1x PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS/1 % BSA für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (300 g, 3 min, 4 °C) und in 50 µl 1x PBS/1 % BSA mit FITC-markierten Antikörpern (siehe Tab. 3) für 30 min bei 4 °C gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen in 500 µl aufgenommen und die Expression der zellspezifischen Oberflächenmoleküle in einem Epics XL Durchflusszytometer (Fa. Beckman Coulter, Fullerton CA, USA) mit der Software EXPO32 ADC XL4 Color (Fa. Beckman Coulter, Fullerton CA, USA) gemessen. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit der Software EXPO32 ADC Analysis (Fa. Beckman Coulter, Fullerton CA, USA).

3.7 Kristallographische Methoden

3.7.1 Kristallisationsscreenings

Die Kristallisationsscreenings wurden in Kooperation mit Dr. Ardi Vahedi und Claudia Alings in der Arbeitsgruppe von Prof. Saenger am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität zu Berlin durchgeführt.

Für die Strukturaufklärung der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin mit seinem Interaktionspartner PhapII wurde die Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen (Luft und DeTitta, 2009) im 96-Well-Format bei 18 °C angewandt.

In allen Kristallisationsscreens betrug das Tropfenvolumen 2,2 µl und das Reservoirvolumen 100 µl. Es wurden die Kristallisationsbedingungen für das PhapII-Protein alleine und zusammen mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin getestet. Da das PhapII-Protein als Dimer vorliegt (Muto et al., 2007), wurde LScyto in Co-Kristallisationsscreens in zweifachem Überschuss eingesetzt. Die Proteine waren in unterschiedlichen Puffern gelöst und wurden in verschiedenen Konzentrationen im Screen eingesetzt (siehe Tab. 10). *Crystal Screen Kits* von den Firmen Qiagen (Hilden, D), Jena Bioscience (Jena, D) und Hampton Research (Aliso Viejo CA, USA) wurden verwendet.

Tab. 10: Konzentrationen der Proteinlösungen, die in Kristallisationsscreens eingesetzt wurden.

Protein
PhapII (10-26 mg/ml) in 20 mM Hepes pH 7,0 ; 150 mM NaCl
PhapII (21-48 mg/ml) in 20 mM Tris/HCl pH 8,0
PhapII (70 mg/ml) und LScyto (140 mg/ml) in 50 mM Tris/HCl pH 8,0
PhapII (70 mg/ml) und LScyto (140 mg/ml) in 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM β-Mercaptoethanol

3.8 Yeast-Two-Hybrid-Assay

3.8.1 Das Yeast-Two-Hybrid-System

Das Yeast-Two-Hybrid-System ermöglicht die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen in *Saccharomyces cerevisiae* (Chien et al., 1991; Fields und Song, 1989). Das System aktiviert dabei die Expression von Reportergenen, die erst nach Wiederherstellung eines funktionellen Transkriptionsfaktors, wie z. B. GAL4 in *S. cerevisiae*, bei einer Interaktion zweier Proteine möglich ist. Meist wird die DNA, die für das zu untersuchende Protein codiert („Bait“-Vektor) an die DNA der GAL4-

Bindedomäne gekoppelt, wobei die cDNA eines potenziellen Interaktionsproteins aus einer cDNA-Bank der untersuchten Spezies an die DNA der GAL4-Aktivierungsdomäne gebunden wird („Prey“-Vektor). Ein Hefestamm (z. B. AH109) wird mit beiden Plasmiden transformiert; im Falle einer Interaktion kommt es zu einer funktionellen Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors und führt zur Expression der Reportergene. Dies ermöglicht auxotrophen Hefezellen, auf Selektionsmedien zu wachsen.

Die durchgeführten Methoden für die Vorbereitung des Yeast-Two-Hybrid-Screens und der Screen selbst wurden in Anlehnung der Benutzerhandbücher von Clontech Laboratories Inc. (*Yeast Protocols Handbook* und *Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits User Manual*) durchgeführt. Für alle folgenden Arbeitsschritte mit *S. cerevisiae* wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet.

3.8.2 *Konstruktion des Bait-Vektors*

Die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin lag bereits als drei Sequenzkopien in dem Vektor pAS2-1 kloniert vor (Kilian, 2002). Das pAS2-1/3xLSCD-Konstrukt wurde für das Screening in den neuen *Bait*-Vektor pGBKT7 umklontiert. In diesem System kann das *Bait*-Protein auch als Fusion mit dem c-Myc-Epitop-tag exprimiert werden. Darüber hinaus ist die *Multiple Cloning Site* (MCS) von pGBKT7 kompatibel mit denen von pMyc-CMV und pHA-CMV und ermöglicht weitere Anwendungsmöglichkeiten in humanen Zelllinien.

3.8.3 *Hefe-Transformation im kleinen Maßstab*

Für den Transformationsansatz wurden 100 ng Plasmid-DNA (pGBKT7, pGBKT7-3xLScyto, pGADT7-RecT oder pGBKT7-p53), 100 µg denaturierte Heringspermien-Träger-DNA (siehe 3.1.2.5) und 100 µl kompetente Zellen (siehe 3.3.3) durch Vortexen gut vermischt, 600 µl frische PEG/LiAc-Lösung hinzugefügt und auf höchster Geschwindigkeit für 10 sec gevortext. Der Ansatz wurde für 30 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert, 70 µl DMSO hinzugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Die Zellen wurden für 15 min bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und danach für 1-2 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden bei maximaler Geschwindigkeit für 5 sec zentrifugiert und in 0,5 ml TE-Puffer resuspendiert. 100-200 µl Zellen wurden auf SD/-Trp-Platten ausgestrichen und für 3-4 Tage bei 30 °C bis zum Erscheinen von Kolonien inkubiert.

TE/LiAc-Puffer pH 7,5:

10 mM	Tris/HCl
1 mM	EDTA
100 mM	Lithiumacetat

PEG/LiAc-Puffer pH 7,5 :

10 mM	Tris/HCl
1 mM	EDTA
100 mM	Lithiumacetat
40 % (w/v)	PEG 4000

3.8.4 Inhibition der Basalexpression des *HIS3* Reportergens

AH109-Zellen, transformiert mit pGBKT7-3x-LScyto, wurden auf SD/-Trp/-His-Agarplatten ausgestrichen, die zusätzlich verschiedene Mengen (0-25 mM) vom kompetitiven Inhibitor des Hefe *HIS3*-Proteins, dem 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) (Bai und Elledge, 1997), beinhalten. Die Hefeplatten wurden anschließend für 3-4 Tage bei 30 °C bis zum Erscheinen von Kolonien inkubiert.

3.8.5 Test auf Toxizität des Bait-Konstrukts

In je 10 ml SD/-Trp-Medium wurden mit pGBKT7 und mit pGBKT7-3x-LScyto transformierte AH109-Zellen aus einer Selektionsplatte gegeben und bei 30 °C und 230 rpm für 16-18 h inkubiert. Die nicht transformierten AH109-Zellen wurden in 10 ml YPDA-Medium unter gleichen Bedingungen wachsen gelassen. Anschließend wurden die Kulturen in 100 ml bis zu einer OD₅₇₈ von 0,1 verdünnt und weiter bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. Für 10 h wurde stündlich ein Aliquot von jeder Kultur abgenommen und die OD₅₇₈ im Eppendorf-Photometer (Fa. Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz GmbH, Hamburg) gemessen. Die letzte Messung erfolgte nach 24 h.

3.8.6 Präparation von Hefeproteinextrakten

2 ml-Übernachtskulturen wurden bei 700 g für 5 min pelletiert und einmal mit 1 ml H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C gekocht und 5 min bei 20 000 g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. 25 µl vom Rohextrakt wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Western Blot analysiert.

3.8.7 Transformation der cDNA-Bibliothek im großen Maßstab (Screen)

In einen Transformationsansatz wurden 20 µl cDNA (Menge von zwei LD-PCR-Reaktionen), 3 µg *Sma*I-linearisiertes *Prey*-Plasmid (pGADT7-Rec oder pGADT7-Rec2), 200 µg denaturierte Heringspermien-Träger-DNA und 600 µl kompetente Zellen (siehe 3.3.3) gegeben und vorsichtig unter Vortexen gemischt. Nach Zugabe von 2,5 ml

PEG/LiAc-Lösung wurde der Ansatz vorsichtig gevortext und für 45 min bei 30 °C inkubiert. Dabei wurden die Zellen alle 15 min gemischt. Anschließend wurden 160 µl DMSO zugegeben, die Zellen gemischt und für 20 min bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen. Hierbei wurden die Zellen alle 10 min gemischt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 700 g wurden die Zellen in 3 ml YPD plus Medium resuspendiert und bei 30 °C und 230 rpm für 90 min zur Transformation und Zellregeneration überlassen. Die Zellen wurden für 5 min bei 700 g pelletiert und in 6 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen. Die gesamten transformierten Zellen wurden in 150 µl-Aliquots 1:1 mit 0,9 % NaCl-Lösung gemischt und auf 145/20 mm SD/-Trp/-Leu/-His/2 mM 3'AT-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert, bis weiße >2 mm große Kolonien erschienen. Als Positivkontrolle wurde der *Prey*-Vektor pGADT-RecT im kleinen Maßstab (siehe 3.8.3) in AH 109-Zellen, die das *Bait*-Plasmid pGBKT7-p53 enthielten, transformiert und auf 100/20 mm SD/-Trp/-Leu/-His/2 mM 3'AT-Agarplatten ausgestrichen.

1.1 x TE/LiAc-Lösung pH 7,5 (frisch hergestellt):

11 mM	Tris/HCl
1,1 mM	EDTA
110 mM	Lithiumacetat

YPD plus Medium (pH 6,5):

40 g	Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)
20 g	Hefeextrakt
4 % (w/v)	Glukose
15 mg	Kanamycin
ad 1 l	H ₂ O

3.8.8 *Selektion positiver Klone*

Um falsch positive Interaktionspartner auszuschließen, wurden Kolonien, die nach der Transformation der cDNA-Bibliothek auf SD/-Trp/-Leu/-His/2 mM 3'-AT gewachsen waren, weiterem Selektionsdruck unterzogen. Dabei wurden sie auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade- und SD/-Trp/-Leu/-Ade/Gal/Raf/X-α-Gal-Agarplatten ausgestrichen und nach 3-4 Tagen Inkubation bei 30 °C auf ihre Wachstumsfähigkeit hin untersucht. Ein positiver Interaktionspartner würde folgende Phänotypen zeigen:

Tab. 11: Erwartetes Wachstumsverhalten bei Interaktion von einem *Prey*-Protein mit dem *Bait*-Protein in transformierten AH109-Zellen auf verschiedenen Selektionsplatten.

Selektionsplatte	Erwarteter Phänotyp
SD/-Trp/-Leu/-His	Wachstum
SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade	Wachstum
SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/Gal/Raf/X- α -Gal	Wachstum, Blaufärbung

3.8.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Positive Klone wurden in 5 ml SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 230 rpm wachsen gelassen. Die Plasmidpräparation erfolgte nach dem Protokoll von Qiagen (*Isolation of plasmid DNA from yeast using the QIAprep Spin Miniprep Kit*) mit den Lösungen des *Nucleospin Plasmid Kits* (Machery Nagel, Düren). Zur Überprüfung der Reinheit und Menge der Isolation wurde die Plasmid-DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und ausgewertet. Da die positiven Klone das *Bait*- und das *Prey*-Plasmid beinhalten und während der Plasmidpräparation auch beide isoliert werden, wurden die Plasmidpräparate in *E. coli* transformiert und auf Ampicillinplatten ausgestrichen. Das *Prey*-Plasmid besitzt eine Ampicillinresistenz und so können nur Klone, die das *Prey*-Plasmid besitzen, wachsen.

3.9 Software und Datenbanken

- National Centre for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- NetNGlc 1.0 (Technische Universität Dänemark): <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
- ExPASy- Bioinformatics Resource Programm <http://www.expasy.org/>
- NetPhos 2.0: <http://www.cbs.dtu.dk>
- KinasePhos: <http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw>
- BIAevaluation Software 3.0 (Fa. GE Healthcare, Freiburg)
- Vector NTI 9.1.0 (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999)

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der Interaktion von PhapII mit L-Selektin

4.1.1 Konstruktion von LScyto-Deletionsmutanten

Zur Identifizierung der PhapII-Bindestelle von LScyto wurden die in Abb. 6 dargestellten LScyto-Deletionsmutanten durch ortsgerichtete Mutagenese (Kapitel 3.1.1.10) hergestellt. Positive Klone wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierung identifiziert. Dabei diente das Konstrukt pGEX4T-1-LScyto (mut) (siehe Tab. 7) als *Template*. Bei der Mutante LScyto Δ C1 wurden die letzten sechs C-terminalen aa Ser-367 bis Tyr-372 mit Hilfe des Primers Cyto Stop 2 SpeI deletiert. Somit fehlt die Phosphorylierungsstelle Ser-367. Die vier basischen Dubletts sind in dieser Mutante noch vorhanden, wodurch weiterhin eine PhapII-Bindung möglich sein sollte. In der zweiten Mutante, LScyto Δ C2, wurden die Aminosäuren Ser-364 bis Tyr-372 mit Hilfe des Primers Cyto Stop 1 HindIII entfernt. Hier fehlt somit das C-terminale Dublett Lys-365/Arg-366 und die weitere Phosphorylierungsstelle Ser-364. Abhängig von der Bedeutung des Dubletts Lys-365/Arg-366 sollte der cytoplasmatische Anteil des verkürzten Proteins der Mutante LScyto Δ C2 schwächer oder nicht an den Interaktionspartner PhapII binden.

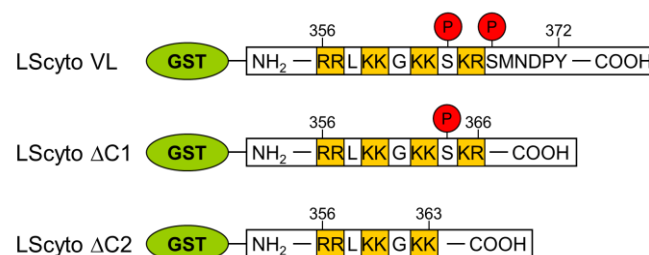


Abb. 6: Deletionsproteine von LScyto.

C-terminale Deletionsproteine der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin wurden als GST-Fusionskonstrukte kloniert, exprimiert und gereinigt. In orange sind die basischen Dubletts gekennzeichnet, mit einem roten „P“ die Serin-Phosphorylierungsstellen. Als Referenz ist LScyto in voller Länge der cytoplasmatischen Domäne (LScyto VL) dargestellt.

Die Deletionskonstrukte wurden in dem *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS exprimiert. Die Expression wurde wie in Kapitel 3.5.2.1 beschrieben durchgeführt und anschließend die Proteine über eine Glutathion-Affinitätschromatographie gereinigt (Kapitel 3.5.2.4).

Die Deletionsproteine wurden anschließend nach Dialyse und Kopplung an GSH-Sepharose für *in vitro*-Bindungsassays eingesetzt.

4.1.2 Identifizierung der PhapII-Bindungsstelle von LScyto

Die Bindungsfähigkeit der LScyto-Deletionsproteine an PhapII wurde mittels *in vitro* Bindungsassays (Kapitel 3.5.4) untersucht. Dabei zeigte sich, dass LScyto Δ C1 und LScyto Δ C2 nicht an PhapII binden konnten (Abb. 7). Im Vergleich zu der Substitutionsanalyse der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin, bei der die mebrandistalen Aminosäurereste nicht essenziell schienen (siehe 1.4.5), führte eine Deletion sechs dieser nicht basischen C-terminalen Aminosäuren zu einem Verlust der Bindung an PhapII.

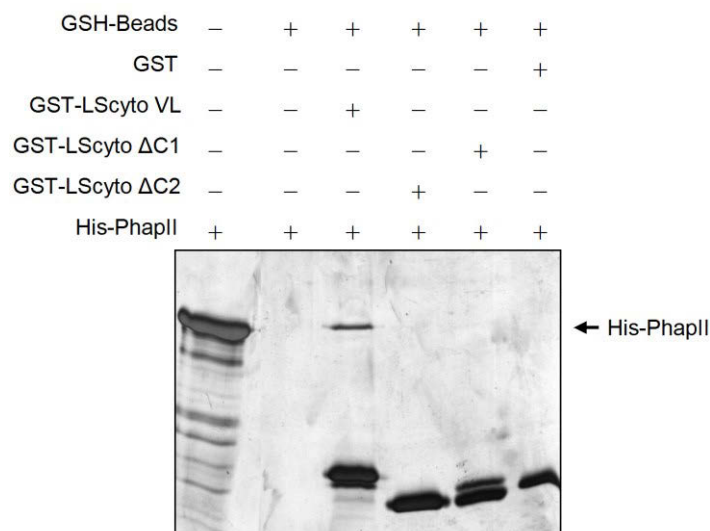


Abb. 7: Bindung von His-PhapII an Deletionsproteine von GST-LScyto.

5 μ g rekombinante GST-LScyto-Deletionsproteine wurden über Nacht bei 4 °C an GSH-Sepharose-Beads gekoppelt. Am nächsten Tag wurden ungebundene Proteine mit 1X TBS entfernt und die Beads anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit 5 μ g His-PhapII inkubiert (molares Verhältnis His-PhapII:GST-LScyto-Varianten 1:1,2-1,3). Als Positivkontrolle wurde GST-LScyto VL an die Beads immobilisiert und mit His-PhapII inkubiert, als Negativkontrollen GST oder kein GST-Fusionsprotein. Ungebundenes His-PhapII-Protein wurde durch viermaliges Waschen mit 1x TBS entfernt. Gebundene His-PhapII-Proteine wurden von den Beads mit 1x SDS-Probenpuffer eluiert und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Zusätzlich wurde 5 μ g His-PhapII-Protein mit 4x SDS-Probenpuffer vermischt, denaturiert und auf das SDS-Gel aufgetragen. Anschließend wurden die einzelnen Eluatfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt.

4.1.3 Konstruktion von *phapII* ΔC -Deletionsmutanten

Mit dem Ziel, die Bedeutung der sauren C-terminalen Aminosäuren von PhapII für die Interaktion mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin zu untersuchen, wurden verschiedene ΔC -Deletionskonstrukte von *phapII* generiert, die in Abb. 8 zusammengestellt sind. Deletionen im 3'-Ende des *phapII*-Gen wurden über PCR generiert, mit folgenden Primer-Sets: T7/Phap 257 rev.XhoI, T7/ Phap 247 rev.XhoI, T7/ Phap 237 rev.XhoI, T7/ Phap 257 rev.XhoI. Als *Template* diente das Volllängenkonstrukt pET45b-*phapII*_Thrombin. Die PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *XhoI* verdaut und rekloniert. Die Plasmid-DNA transfizierter Zellen wurde durch Sequenzierung überprüft. (Abb. 8).

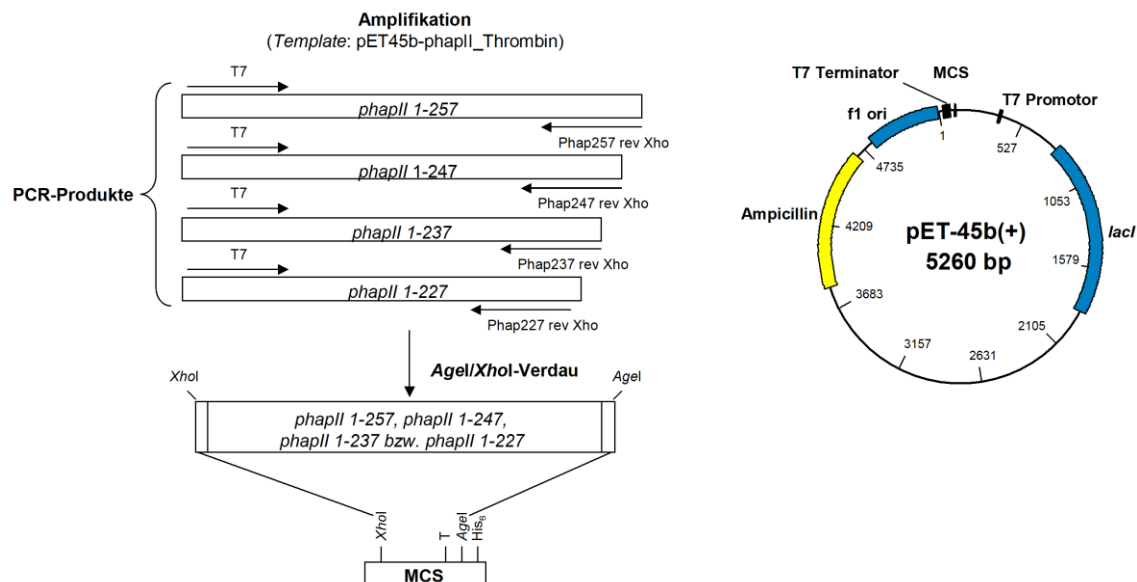


Abb. 8: Strategie zur Generierung von *phapII*-Deletionskonstrukten.

Mit Hilfe von spezifischen Primern wurde das 3'-Ende von *phapII* verkürzt und die DNA-Fragmente mit den Restriktionsenzymen *Agel* und *XhoI* verdaut. Die *phapII*-Fragmente wurden anschließend in den ebenfalls *Agel* und *XhoI* geschnittenen pET-45b(+)-Vektor kloniert. MCS, Multiple Cloning Site; Ampicillin, Ampicillinresistenzgen; f1 ori, Replikationsursprung des Bakteriophagen f1; *lacI*, Repressor des *lac*-Operons; T, Thrombinschnittstelle.

4.1.4 Expression und Reinigung der PhapII-Deletionsproteine

Zur Herstellung der deletierten PhapII-Proteine wurden die jeweiligen Vektoren in dem *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS exprimiert (Kapitel 3.5.2.1) und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Kapitel 3.5.2.3). Einzelne Fraktionen der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt (Abb. 9).

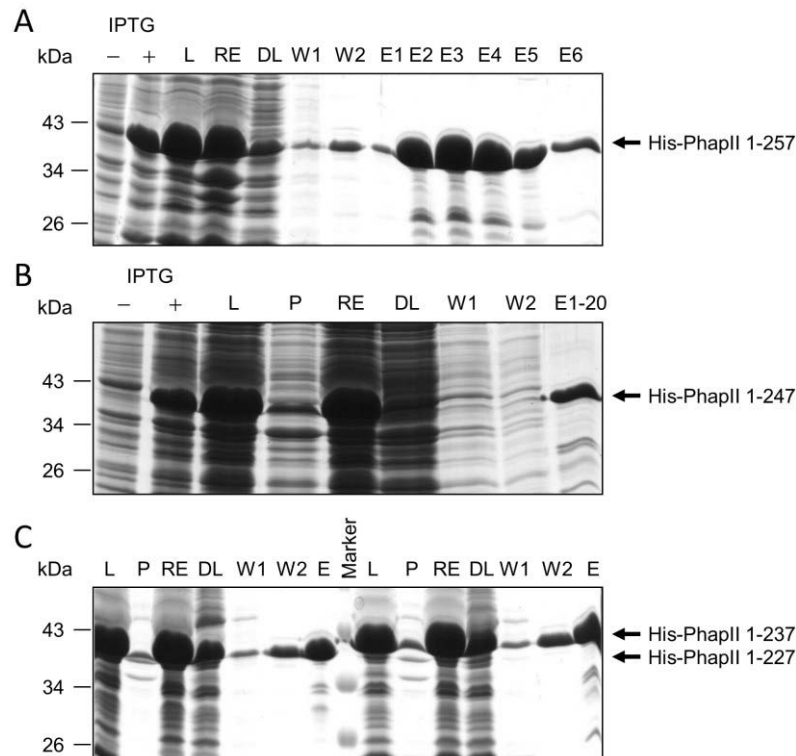


Abb. 9: Expression und Reinigung von PhapII-Deletionsproteinen.

Je 0,5-1 l Expressionskultur wurden in der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C mit 1 mM IPTG induziert und die Bakterienzellen nach 2 h geerntet. Der hergestellte Rohextrakt wurde über Ni-NTA passagiert. Fraktionen der Reinigung wurden anschließend über SDS-PAGE analysiert und Coomassie gefärbt. Reinigungsfraktionen von (A) His-PhapII 1-257; (B) His-PhapII 1-247; (C) His-PhapII 1-227 (links) und His-PhapII 1-237 (rechts) sind dargestellt. -IPTG, Gesamtzelllysate vor Induktion; +IPTG, Gesamtzelllysate nach Induktion; L, Lysat nach Zellaufschluss; P, Pellet nach Zellaufschluss; RE, Rohextrakt; DL, Durchlauf; W1, 1. Waschfraktion; W2, 2. Waschfraktion; E, Eluat, ggf. mit Fraktionsnummern.

4.1.5 Lokalisation der LScyto-Bindungsstelle von PhapII

Frühere Untersuchungen charakterisierten bereits die Interaktion von PhapII mit LScyto mittels verschiedener Methoden (Proteinbindungsassays, Oberflächenplasmonresonanz) (Kilian et al., unveröffentlichte Daten). Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) wurde daher nachfolgend die Bindungsfähigkeit von PhapII-Deletionsproteinen an LScyto untersucht.

Das N-terminal biotinylierte LScyto-Peptid (Bio-bA-RRLKKGKKSKRSMNDPY) wurde, wie in Kapitel 3.5.7 beschrieben, während der SPR-Messungen als immobilisierter Ligand eingesetzt. Die His-getaggten Deletionsproteine von PhapII wurden anschließend als Analyt über die Chipoberfläche geleitet. In Abb. 10 sind die Sensorgramme der Wechselwirkung von PhapII Wildtyp (WT) und den Deletionsproteinen dargestellt. Alle Deletionsproteine zeigten, im Vergleich zu PhapII WT, ein geringeres Signal, das auch

mit der geringeren molaren Masse der Deletionsproteine zusammenhängen kann, da die Signalstärke einer Interaktion im SPR-System durch die molare Masse des Analyten beeinflusst wird. Trotz weniger saurer Aminosäurereste am C-Terminus zeigte PhapII 1-247 eine stärkere Bindung als PhapII 1-257. Bei der Mutante PhapII 1-227 war gar kein Bindungssignal mehr zu beobachten, obwohl PhapII 1-237 eine gute Bindung an LScyto noch zeigte. Der Aminosäurebereich 227 bis 237 von PhapII scheint essenziell für die Bindung an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin zu sein; die übrigen C-terminalen sauren Aminosäurereste scheinen eher an der Erhöhung der Affinität von PhapII an LScyto beteiligt zu sein.

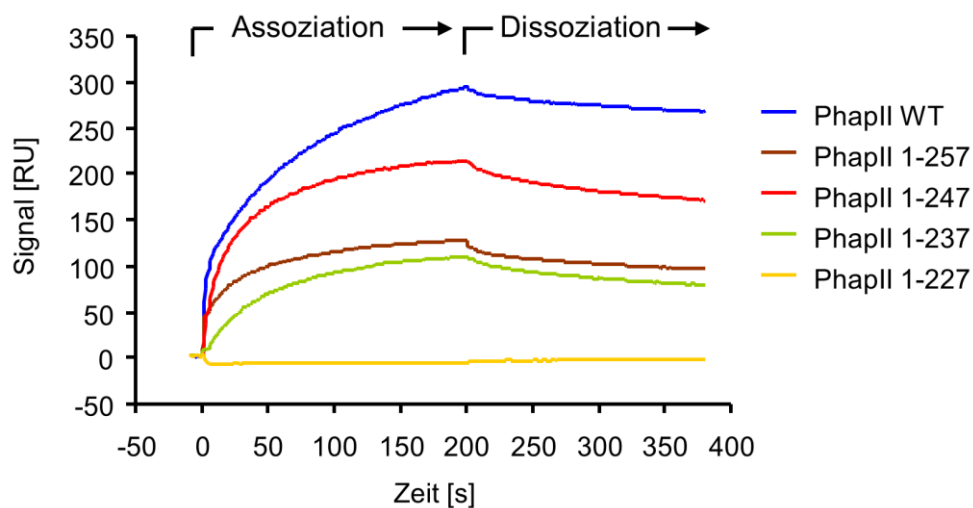


Abb. 10: Sensorgramme der Bindung von PhapII-Deletionsproteinen an Bio-LScyto.

Die Interaktion von PhapII-Deletionsproteinen mit immobilisiertem LScyto-Peptid wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz in einem BIAcore X bei 25 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min untersucht. Für die Messung wurden 100 µl einer 250 nM gereinigten Proteinlösung der Varianten His-PhapII 1-257, His-PhapII 1-247, His-PhapII 1-237, His-PhapII 1-227 oder His-PhapII WT eingesetzt. Unspezifische Interaktionen aufgrund von entgegengesetzten Ladungen beider Proteine (Kontrollspur) wurden während der Messung sofort von der Spur mit Bio-LScyto-Peptid abgezogen. Pro PhapII-Variante wurden drei Einzelmessungen durchgeführt. Der Mittelwert dieser Messungen ist dargestellt. Die Zusammenstellung der Bindungskurven erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms BIAevaluation 3.0.

Die Deletionsproteine interagierten darüber hinaus mit unterschiedlichen Affinitäten mit LScyto. So zeigte sich unter der Annahme eines 1:1 Langmuir-Bindungsmodells für das Deletionsprotein PhapII 1-257 ein K_D -Wert von 24,6 nM, der 17-fach größer ist als der K_D -Wert von PhapII WT (1,43 nM) (Tab. 12). Da die Dissoziationskonstante sich aus dem Verhältnis von Dissoziationsrate zu Assoziationsrate ergibt (k_d/k_a), ist die sehr starke Erhöhung des K_D -Wertes für PhapII 1-257 auf die erniedrigte Assoziationsrate (k_a)

zurückzuführen (Tab. 12). Das bedeutet, dass die Assoziation des Deletionsproteins an LScyto langsamer geworden ist. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass trotz bestehender Bindungsfähigkeit von PhapII 1-257 die 20 C-terminalen sauren Aminosäurereste für die schnelle Interaktion an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin von Bedeutung sind und diese gleichzeitig die Bindung stabilisieren. Je weiter der saure C-terminale Abschnitt von PhapII deletiert wurde, desto schwächer wurde die Affinität zu LScyto (Tab. 12). Es zeigt sich allerdings, dass die weitere Deletion des Aminosäurebereiches 257-248 keinen gravierenden Einfluss auf die Affinität erzeugt, wobei die Deletion der Aminosäuren 247-238 bis zu einer 8-fachen Erhöhung des K_D -Wertes führt (Tab. 12).

Tab. 12: Kinetische Parameter der Interaktion von verschiedenen PhapII-Deletionsproteinen mit Bio-LScyto. Die Messungen wurden mit dem BIAcore X bei 25 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min durchgeführt. Für die Ermittlung kinetischer Daten wurden fünf verschiedene Konzentrationen als Dublikat je PhapII-Protein als Analyt über das immobilisierte Bio-LScyto-Peptid, geleitet. Die Datenanalyse und die Bestimmung der kinetischen Parameter K_D , k_a und k_d erfolgten mit Hilfe des Programms BIAevaluation 3.0 unter Annahme eines stöchiometrischen Bindungsverhältnisses von 1:1 mit der Besonderheit einer *Drifting Baseline*. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei Messungen.

	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
His-PhapII WT	1,43	$3,78 \cdot 10^6$	$5,36 \cdot 10^{-3}$
His-PhapII 1-257	24,6	$1,64 \cdot 10^5$	$3,93 \cdot 10^{-3}$
His-PhapII 1-247	21,5	$2,34 \cdot 10^5$	$4,93 \cdot 10^{-3}$
His-PhapII 1-237	173	$2,44 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^{-3}$

4.1.6 *Mutation der Phosphorylierungsstelle Ser-9 von PhapII*

Die Phosphorylierung von PhapII an den Positionen Ser-9 und Ser-24 wurde bereits mittels Radiosequenzierungsanalysen nachgewiesen (Adachi et al., 1994). Beide Positionen besitzen das Sequenzmotiv Ser-X-Arg/Lys, das eine mögliche Konsensussequenz für die Proteinkinase C darstellt (Kishimoto et al., 1985). Nach wie vor ist nicht eindeutig geklärt, welche Funktion die Phosphorylierung von PhapII hat. Um zu überprüfen, ob die Imitierung einer Phosphorylierung an Ser-9 eine Auswirkung auf die Bindung an LScyto hat, wurde mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese (Kapitel 3.1.1.10) Ser-9 gegen Alanin (A) bzw. gegen Glutaminsäure (E) ausgetauscht. S9E imitiert dabei eine strukturelle Phosphorylierung, wobei S9A eine nicht-phosphorylierbare Form von PhapII darstellt (Abb. 11).

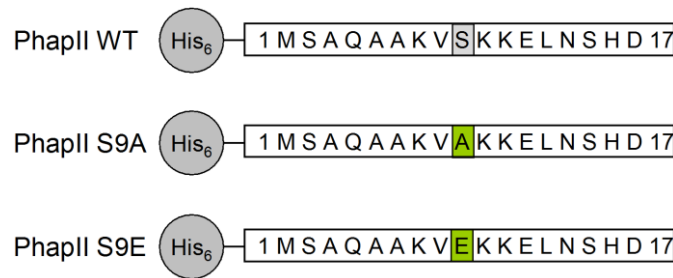


Abb. 11: Ser-9-Mutanten von PhapII.

An der Position Ser-9 besitzt PhapII eine Phosphorylierungsstelle („S“ in Grau) (Adachi et al., 1994). Um den Einfluss der Phosphorylierung auf die Bindung an LScyto zu überprüfen, wurde durch eine Mutation an Ser-9 gegen Glutaminsäure eine strukturelle Phosphorylierung imitiert (PhapII S9E) und durch eine Mutation gegen Alanin an dieser Stelle eine nicht-phosphorylierbare Form von PhapII generiert (PhapII S9A). Es sind nur die ersten 17 Aminosäurereste von PhapII dargestellt. Die mutierte Stelle ist grün markiert. Als Referenz ist PhapII Wildtyp ebenfalls aufgeführt (PhapII WT). Alle Konstrukte wurden für die Isolierung mit einem His₆-tag versehen.

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurden das Konstrukt pET45b-phapII_Thrombin und die Primer Set E9 fwd/ T7 ter bzw. Set A9 fwd/ T7 ter verwendet. Zur Proteinexpression wurden die Expressionsplasmide in den *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS transformiert (Kapitel 3.5.2.1). Die His₆-PhapII-Fusionsproteine wurden mittels einer Ni-NTA-Affinitätssäule gereinigt und anschließend die Bindungseigenschaften mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht (Abb. 12A und B). Im Rahmen der Bindungsstudien wurde immobilisiertes LScyto-Peptid als Bindungspartner verwendet. Als Kontrollprotein wurde nicht mutiertes His₆-PhapII eingesetzt. In Abb. 12A und B sind die Bindungskurven von His₆-PhapII und den beiden Serinmutanten His₆-PhapII S9E und His₆-PhapII S9A dargestellt. Die Serinmutanten zeigten untereinander und im Vergleich zu dem Wildtyp keine wesentlichen Unterschiede in ihrer Bindungsstärke. Insgesamt hat die Imitierung einer Phosphorylierung an Serin-9 keinen Einfluss auf die Bindungsaktivität von PhapII an LScyto.

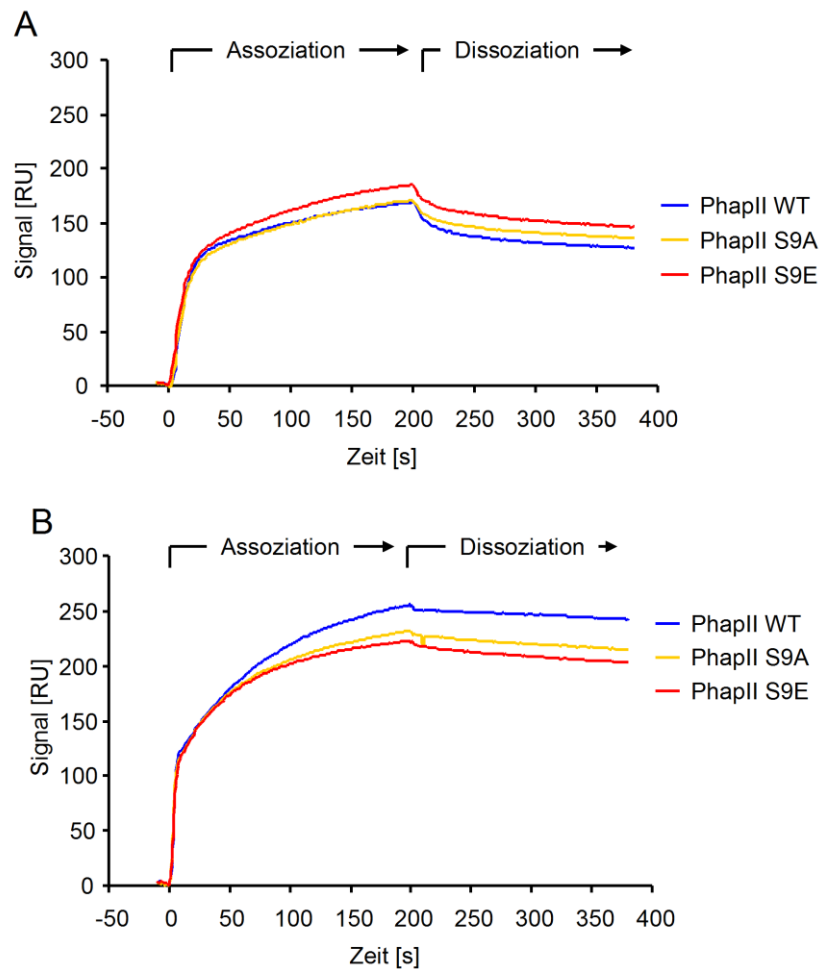


Abb. 12: Untersuchung der Interaktion der Ser-9-Mutanten mit LScyto.

Die Interaktion von Serinmutanten mit immobilisiertem LScyto-Peptid wurde mit Hilfe der SPR in einem BIAcore X bei 25 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min untersucht. Für die Messung wurden jeweils 100 µl gereinigte Proteinlösung der Varianten His-PhapII S9A, His-PhapII S9E und His-PhapII WT in einer Konzentration von **(A)** 40 nM und **(B)** 250 nM eingesetzt. Unspezifische Interaktionen aufgrund von entgegengesetzten Ladungen beider Proteine (Kontrollspur) wurden während der Messung sofort von der Spur mit Bio-LScyto-Peptid abgezogen. Pro PhapII-Variante wurden drei Einzelmessungen durchgeführt. Der Mittelwert dieser Messungen ist dargestellt. Die Zusammenstellung der Bindungskurven erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms BIAevaluation 3.0.

4.2 Rolle von PhapII beim L-Selektin vermittelten Signalling

In Leukozyten und humanen leukämischen T-Zelllinien wie Jurkat konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit PMA oder durch Crosslinking von CD3 die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin an ihren beiden Serinresten phosphoryliert wird (Haribabu et al., 1997; Kilian et al., 2004). Die Phosphorylierung wird durch die Isozyme θ und ι der Proteinkinase C katalysiert. Die Phosphorylierung hat zur Folge, dass PhapII nicht mehr an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin binden kann (Kilian et al., unveröffentlichte Daten). Darüber hinaus ist PhapII ein Inhibitor der Protein Phosphatase

2A (PP2A) (Li et al., 1996). In den folgenden Kapiteln werden die Interaktionen von PhapII und PP2A mit LScyto charakterisiert und deren Rolle in der L-Selektin vermittelten Signaltransduktion untersucht.

4.2.1 *Dephosphorylierung von LScyto durch PP2A*

Zunächst wurde überprüft, ob phosphoryliertes LScyto ein Substrat für PP2A darstellt. Hierfür wurde ein Malachitgrün basierter Dephosphorylierungsassay eingesetzt, bei dem die Phosphatfreisetzung durch Farbkomplex-Bildung quantifiziert wird. Die Menge des freigesetzten Phosphats korreliert dabei mit der Enzymaktivität von PP2A. In diesen Untersuchungen wurden LScyto-Peptide verwendet, die jeweils einfach (LScyto P364 und LScyto P367) und zweifach phosphoryliert (LScyto P364+P367) waren. Die Ergebnisse zeigten, dass PP2A beide Serinreste des Peptids dephosphorylieren kann, wobei je nach Position unterschiedliche Mengen an Phosphat freigesetzt wurden (Abb. 13). Dies deutet auf eine gewisse Präferenz der PP2A für das phosphorylierte Ser-367.

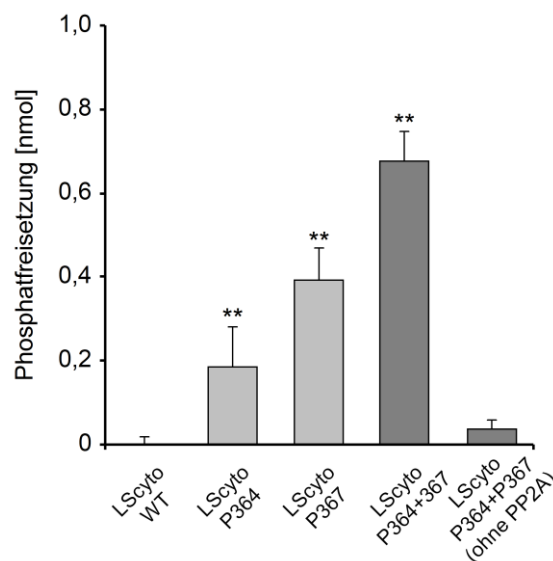


Abb. 13: Nachweis der Dephosphorylierung von LScyto-Phosphopeptiden durch PP2A mittels Malachitgrün basiertem Phosphataseassay.

Verschiedene LScyto-Phosphopeptide (siehe Abbildung) wurden durch Zusatz von 0,05 U PP2A dephosphoryliert und die Phosphatfreisetzung mittels Malachitgrün-basiertem Assay nachgewiesen. Als Negativkontrolle diente der Ansatz mit nicht phosphoryliertem LScyto (Bio-LScyto WT); diese wurde von allen Werten abgezogen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von sechs Einzelwerten aus drei unabhängigen Experimenten. $P < 0.005$ wurde mittels Student *t*-Test ermittelt und als ** angegeben.

Die Relevanz der PP2A-vermittelten Dephosphorylierung von L-Selektin konnte auch im zellulären Kontext anhand von Jurkat T-Zelllysaten als Phosphatasequelle im

Malachitgrün basierten Assay gezeigt werden (Abb. 14A). Dabei konnte die Dephosphorylierung durch okadaische Säure (OA), einen Phosphatase-Inhibitor, konzentrationsabhängig unterdrückt werden. OA kann bei hohen Konzentrationen ($>1 \mu\text{M}$) auch PP1 inhibieren. Um auszuschließen, dass die verminderte L-Selektin-Dephosphorylierung nicht durch die Inhibition der PP1-Aktivität durch OA zurückzuführen ist, wurde zusätzlich NIPP-1 (*nuclear inhibitor of protein phosphatase-1*), ein spezifischer Inhibitor von PP1, eingesetzt. Dies führte zu keiner signifikanten Verminderung der L-Selektin-Dephosphorylierung durch PP1 und deutet auf eine Beteiligung von PP2A und nicht PP1 als L-Selektin-Phosphatase hin. Auch der Einsatz von PhapII, einem physiologischen PP2A-Inhibitor, konnte die Dephosphorylierung von L-Selektin durch PP2A reduzieren (Abb. 14B). So kann PP2A eine maßgebliche Rolle in der zellulären L-Selektin-Dephosphorylierung zugesprochen werden.

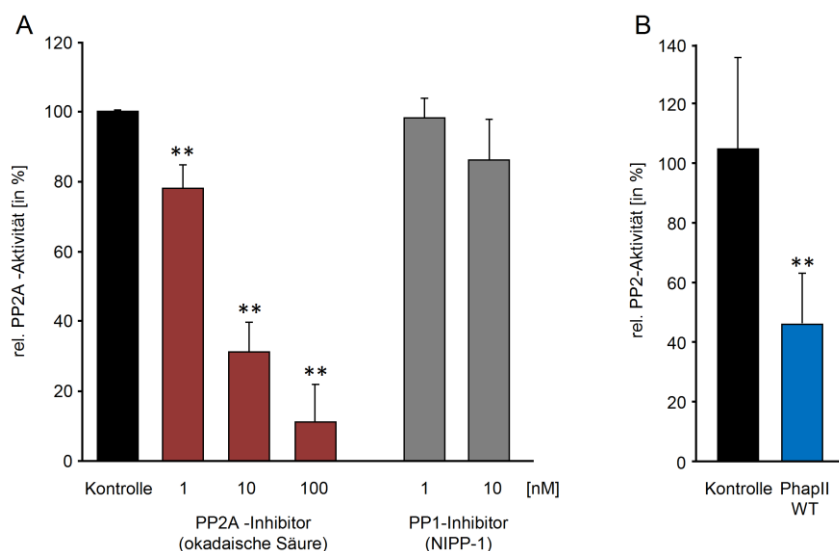


Abb. 14: Inhibition der Phosphataseaktivität von PP2A durch okadaische Säure (A) und PhapII (B).

Die PP2A-Inhibition wurde in einem Malachitgrün basiertem Phosphataseassay geprüft. (A) 2×10^6 Jurkat T-Zellen wurden lysiert und von zellulärem Phosphat befreit. Der Überstand der Jurkat T-Zelllysate wurde als Proteinphosphatasequelle mit verschiedenen Konzentrationen an OA oder NIPP-1 vorinkubiert und die Dephosphorylierung durch Zusatz von Bio-LScyto P364+P367 gestartet. Die Phosphatfreisetzung wurde im Malachitgrün-basiertem Assay geprüft. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne PP2A; diese wurde von allen Werten abgezogen. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten gezeigt. (B) 0,031 U PP2A wurde mit $30 \mu\text{M}$ bei RT vorinkubiert und anschließend die Dephosphorylierung durch Zusatz von Bio-LScyto P364+P367 gestartet. Die Phosphatfreisetzung wurde im Malachitgrün-basiertem Assay geprüft. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne PP2A; diese wurde von allen Werten abgezogen. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwölf Einzelwerten aus sechs unabhängigen Experimenten gezeigt. $P < 0.005$ wurde mittels Student *t*-Test ermittelt und als ** angegeben.

Die direkte Interaktion zwischen PhapII und PP2A konnte mittels GST-Pull-Down-Assay gezeigt werden. In den verwendeten Jurkat T-Zellen zeigte sich eine Assoziation von PP2A und PhapII. Diese konnte durch die Stimulation der Zelle mit PMA verstärkt werden (Abb. 15). Wurde statt GST-PhapII GST im Pull-Down-Assay eingesetzt, fand sich keine Bindung von PP2A an die Beads. PP2A wird somit an PhapII und nicht an GST gebunden (s. Abb. 15, die zwei hintersten Banden).

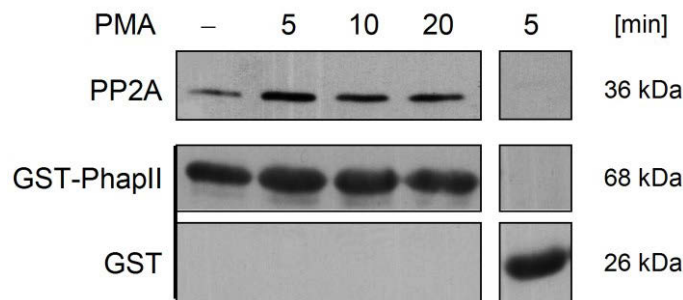


Abb. 15: *In vitro*-Bindungsassay zum Nachweis der PP2A-PhapII-Interaktion nach L-Selektin-Phosphorylierung.

Jurkat T-Zellen wurden unstimuliert belassen oder 5, 10 oder 20 min mit PMA stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Zellysate mit GST-PhapII gekoppelten GSH-Beads inkubiert. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht wurden die an Beads assoziierten Proteine durch Erhitzen in 1x SDS-Probenpuffer eluiert und die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die anschließende Western Blot-Analyse wurde mit anti-PP2A-Antikörper durchgeführt. Als Ladekontrolle diente GST-PhapII bzw. GST detektiert mit anti-GST-Antikörper.

Die Stimulation von T-Zellen mit PMA führt zu einer PKC-abhängigen Phosphorylierung von L-Selektin an seinen Serinresten (Haribabu et al., 1997; Kilian et al., 2004). Die Ergebnisse hier zeigen, dass die Interaktion zwischen PhapII und PP2A im Zuge der L-Selektin-Phosphorylierung erhöht wird. Dieser Mechanismus deutet darauf hin, dass neu phosphoryliertes LScyto nicht sofort von PP2A dephosphoryliert wird.

Als nächstes wurde in einem GST-Pull-Down-Assay mit Jurkat T-Zellysaten untersucht, ob PP2A auch an nicht phosphoryliertes LScyto bindet. Sowohl der Pull-Down-Assay als auch die SPR-Analyse zeigten eine, wenn auch schwache, Bindung von PP2A an nicht phosphoryliertes LScyto (Abb. 16A und B). Als Positivkontrolle im Pull-Down-Assay diente die Interaktion von PP2A mit GST-PhapII und als Negativkontrolle die Interaktion von GST allein.

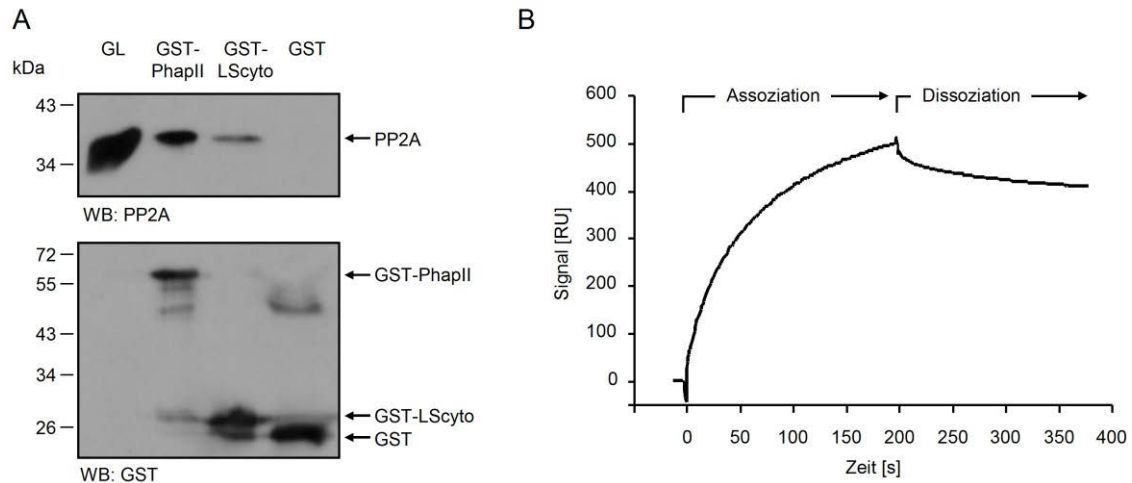


Abb. 16: Nachweis der PP2A-LScyto-Interaktion.

(A) *in vitro* Bindungsassay. Jurkat-T-Zellen wurden lysiert und die Zellysate mit GST-LScyto bzw. GST-PhapII gekoppelten GSH-Beads inkubiert. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht, wurden an Beads assoziierte Proteine durch Erhitzen in 1x SDS-Probenpuffer eluiert und die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die anschließende Western Blot-Analyse wurde mit anti-PP2A-Antikörper durchgeführt. Als Ladekontrolle diente die Detektion mit anti-GST-Antikörper. GL, Gesamtzellysate vor Inkubation mit GSH-Beads als Nachweis von PP2A (B) Die LScyto/PP2A-Interaktion wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz in einem BIAcore X bei 25 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min untersucht. Für die Messung wurde 100 µl 0,031 U PP2A eingesetzt. Unspezifische Interaktionen mit der Kontrollspur wurden während der Messung sofort von der Spur mit Bio-LScyto-Peptid abgezogen. Es wurden drei Einzelmessungen durchgeführt, die von der Kontrollspur abgezogen wurden. Der Mittelwert dieser Messungen ist dargestellt. Die Zusammenstellung der Bindungskurven erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms BIAevaluation 3.0.

Welchen Einfluss nicht phosphoryliertes LScyto auf die Enzymaktivität von PP2A hat, ließ sich im Malachitgrün basiertem Dephosphorylierungsassay feststellen. Das nicht phosphorylierte LScyto konnte konzentrationsabhängig PP2A inhibieren und deutet auf eine weitere Regulierung der Dephosphorylierung von LScyto durch das nicht phosphorylierte LScyto hin (Abb. 17).

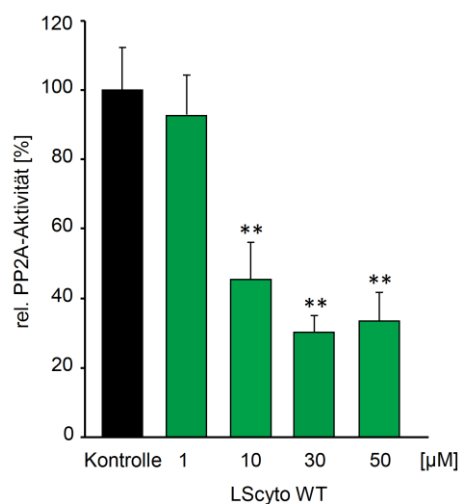


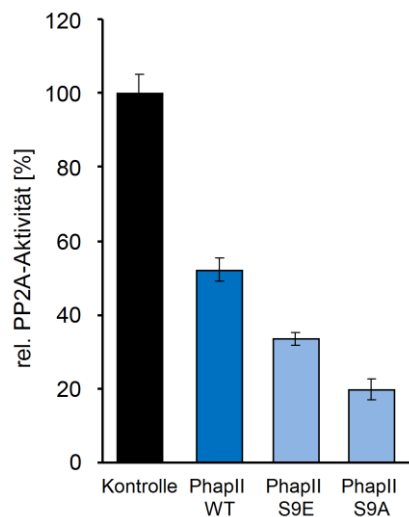
Abb. 17: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 17: Inhibition der Phosphataseaktivität von PP2A durch nicht phosphoryliertes LScyto.

Verschiedene Konzentrationen von Bio-LScyto WT (siehe Abbildung) wurden mit 0,031 U PP2A vorinkubiert und die Dephosphorylierung durch Zusatz von 5 µg (=40 µM) Bio-LScyto P364+P367 gestartet. Die Phosphatfreisetzung wurde in einem Malachitgrün basiertem Assay geprüft. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne PP2A. Der Wert der Negativkontrolle wurde von allen Werten abgezogen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messungen. $P < 0.005$ wurde mittels Student *t*-Test ermittelt und als ** angegeben.

4.2.2 Einfluss von PhapII-Mutanten auf die PP2A-Aktivität

Arbeiten von ten Klooster et al. (2007) konnten zeigen, dass eine Imitierung einer strukturellen Phosphorylierung an Ser-9 die Dimerisierung von PhapII verhindert und die Bindung an Protein Phosphatase 2A begünstigt. Daher wurden mittels Malachitgrün basierten Assays die Ser-9-Mutanten (siehe 3.5.6) hinsichtlich ihrer Einflüsse auf die Hemmung der PP2A-Aktivität untersucht. Insgesamt zeigten beide Ser-9-Mutanten eine bessere Inhibition der L-Selektin-Dephosphorylierung als der Wildtyp, wobei die Mutanten untereinander keine großen Unterschiede in ihren inhibitorischen Aktivitäten hatten (siehe Abb. 18). Daher scheint die Imitierung einer strukturellen Phosphorylierung an Ser-9 keinen Einfluss auf die Bindung von PhapII an PP2A und deren Inhibition zu haben.

**Abb. 18: Ser-9 mutierte PhapII-Formen inhibieren PP2A effektiver als Wildtyp-PhapII.**

30 µM PhapII WT, PhapII S9E oder PhapII S9A wurden mit 0,031 U vorinkubiert und die Dephosphorylierung durch Zusatz von 5 µg Bio-LScyto P364+P367 gestartet. Die Phosphatfreisetzung wurde im Malachitgrün-basierten Assay geprüft. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne PP2A. Der Wert der Negativkontrolle wurde von allen Werten abgezogen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte von einem Experiment mit Doppelbestimmung.

4.3 Konstruktion, Expression und Charakterisierung von PhapII

Zur heterologen Expression von PhapII in *E. coli* und in eukaryotischen Systemen standen in unserer Arbeitsgruppe verschiedene Konstrukte zur Verfügung, die von Frau Dr. Karin Kilian hergestellt wurden. Die Herstellung der für eine Kristallisation notwendigen Proteinmengen wurden zunächst mit Hilfe des Expressionsvektors pASK-IBA5-phapII (Strep-tag II-System) versucht. Es zeigte sich jedoch, dass sich mit diesem Konstrukt keine ausreichenden Mengen von PhapII produziert werden können. Zudem weist dieses Konstrukt keine Proteaseschnittstelle auf, um den N-terminalen Fusionspartner, ein acht Aminosäuren großes, Streptavidin bindendes Peptid, abzuspalten.

Darauf hin wurde für die PhapII-Expression das Konstrukt pGEX5X-2-phapII (GST-tag-System) verwendet. Dies lieferte zwar größere Proteinmengen; die Abspaltung des GST-tags mittels Faktor Xa-Protease führte jedoch gleichzeitig zum Verdau des PhapII-Proteins. Daher war es zunächst notwendig, ein geeignetes Expressions- und Reinigungssystem für PhapII zu etablieren.

4.3.1 Klonierung von *phapII* in *pET22b* (+)

Bei dem pET22b(+)-Vektor handelt es sich um ein T7-RNA-Polymerase basiertes Expressionssystem, das eine periplasmatische Expression eines Proteins mit einem C-terminalen His₆-tag ermöglicht. Somit können Proteine nach der Expression über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Kapitel 3.5.2.3) gereinigt werden.

Für die Klonierung in den Vektor pET22b(+) wurde das *phapII*-Gen zunächst über eine PCR mit den Primern Phap f NdeI und Phap r Stop aus dem pASK-IBA5-phapII-Konstrukt herausamplifiziert und in den Zwischenvektor pCR-Blunt II-Topo *blunt* kloniert (Abb. 19).

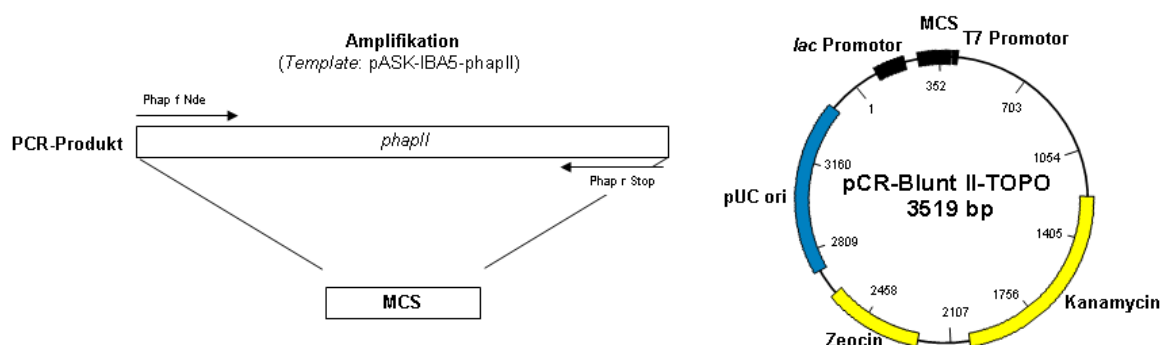
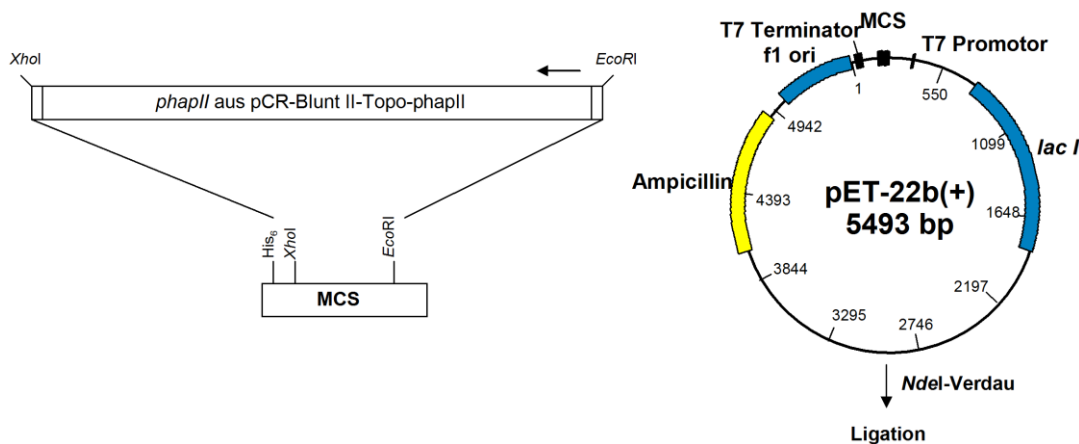


Abb. 19: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 19: Klonierung des *phapII*-PCR-Produktes in den Zwischenvektor pCR-BluntII-Topo.

Die *phapII*-DNA wurde in einer PCR-Reaktion mit Hilfe der Primer Phap f NdeI und Phap r Stop amplifiziert und in den pCR-BluntII-Topo-Vektor *blunt* kloniert. MCS, Multiple Cloning Site; pUC ori, ColE1-Replikationsursprung; Kanamycin, Kanamycinresistenzgen; Zeocin, Zeocinresistenzgen.

Mit Hilfe der Kolonie-PCR wurde nach positiven Klonen gescreent; zwei positive Klone wurden daraufhin mit T7-Primern sequenziert und bestätigt. Das Insert wurde aus dem Zwischenvektor durch *EcoRI*- und *XhoI*-Restriktionsverdau herausgeschnitten, gereinigt und ebenfalls in den *EcoRI/XhoI* verdauten pET22b(+) kloniert (Abb. 20).

**Abb. 20: Konstruktion des Expressionsvektors auf Basis des pET22b(+)-Plasmids zur Herstellung von C-terminal His₆-getagtem PhapII-Protein.**

Das *phapII*-Gen wurde über einen *EcoRI/XhoI*-Restriktionsverdau aus dem Zwischenkonstrukt pCR-BluntII-Topo herausgeschnitten und in den ebenfalls *EcoRI/XhoI* verdauten Vektor pET22b(+) kloniert. Plasmide aus positiven Klonen wurden mit *NdeI* geschnitten, um die vektorstämmige Sequenz aus dem pCR-BluntII-Topo-Vektor und die *pelB*-Signalsequenz des pET22b(+)-Vektors zur periplasmatischen Lokalisation des Fusionsproteins zu entfernen. Das PhapII-Protein konnte somit im Cytoplasma exprimiert werden. MCS, Multiple Cloning Site; f1 ori, Replikationsursprung des Bakteriophagen f1; Ampicillin, Ampicillinresistenzgen; *lacI*, Repressor des *lac*-Operons.

Um die vektorstämmige Sequenz aus dem pCR-BluntII-Topo-Vektor zu entfernen und eine cytoplasmatische Expression des PhapII-Proteins zu ermöglichen, wurde das pET22b-phapII-Konstrukt mit *NdeI* verdaut, ligiert und in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert. Das Konstrukt besitzt so keine *pelB*-Signalsequenz mehr zur periplasmatischen Lokalisation des Fusionsproteins. Nach einer Plasmidpräparation wurden positive Klone mit Hilfe eines Restriktionsverdaus identifiziert und in einer anschließenden Sequenzierung mit T7-Primern weiter überprüft.

4.3.2 Expression mit dem pET22b (+)-Vektor

Zum Nachweis der erfolgreichen Proteinexpression frisch klonierter Fusionsgene in dem pET22b(+)-Vektor wurde dieser zunächst in den *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS transformiert und die Expression der Zellen im kleinen Maßstab durchgeführt (Kapitel 3.5.2.1). Als Negativkontrolle fungierten Rosetta (DE3) pLysS-Zellen, die nur mit dem pET22b(+)-Vektor transformiert wurden. Der Rosetta (DE3) pLysS-Stamm ist ein BL21 (DE3)-Abkömmling und besitzt zusätzliche tRNAs für sechs Codone, die in *E. coli* selten vorkommen (Li et al., 2003). Die seltenen tRNAs sitzen bei diesem Stamm auf demselben Plasmid, das die T7-Lysozym- und das *lac*-Repressorgen trägt. Gesamtzelllysate nach Induktion wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt.

Die errechnete molare Masse für das C-terminal His-getaggte PhapII-Protein beträgt 33,1 kDa. In den Gesamtzelllysaten mit dem pET22b-phapII zeigten sich zwei prominente Proteinbanden von 42 kDa und 32 kDa, die im Lysat der Negativkontrolle nicht nachweisbar waren (Abb. 21A). Bei der Beurteilung des Laufverhaltens von PhapII ist zu beachten, dass wahrscheinlich die sauren C-terminalen Aminosäurereste trotz SDS des Probenpuffers zu einem veränderten Laufverhalten führen. Auch andere Proteine wie Caldesmon oder Tropomyosin, die eine große Anzahl von sauren Aminosäureresten besitzen, zeigen ein verändertes Migrationsverhalten in SDS-Polyacrylamidgelen (Qinwei und Jackowski, 2002).

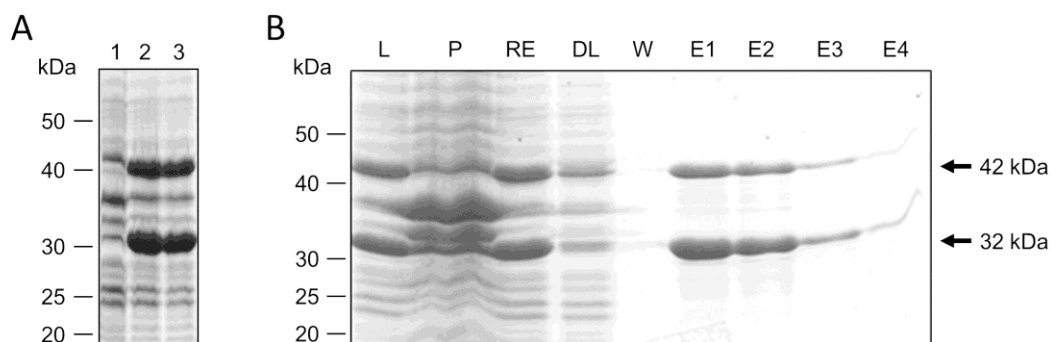


Abb. 21: Expression von PhapII-His in *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS nach Induktion mit 1 mM IPTG und Reinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

(A) Die Ergebnisse der Expression sind auf einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung dargestellt. In allen Spuren wurden Gesamtzelllysate nach Induktion aufgetragen. In Spur 1 wurden die *E. coli*-Zellen mit dem Leervektor pET22b(+) transformiert, in Spur 2 der Klon 2 und in Spur 3 der Klon 3 des Konstrukts pET22b-phapII. (B) Das Zellpellet aus Klon 3 wurde lysiert und anschließend einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie unterzogen. Verschiedene Reinigungsfraktionen wurden auf ein 10 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. L, Lysat nach Zellaufschluss; P, Pellet nach Zellaufschluss; RE, Rohextrakt; DL, Durchlauf; W, Waschfraktion; E1-E4, Eluate.

Die His₆-getaggten Proteine wurden über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgetrennt; im Eluat zeigten sich stets beide Proteinbanden bei 42 kDa und 32 kDa (Abb. 21B).

Zur Identifizierung der beiden Polypeptidbanden wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass das 32 kDa große Protein zwar durch den anti-His-Antikörper, jedoch nicht durch den anti-I2PP2A-Antikörper (Klon E-15), der gegen ein Epitop zwischen der Aminosäure 40 und 90 am N-Terminus von PhapII gerichtet ist (anti-N-I2PP2A), erkannt wurde (Abb. 22A und B). Dies weist darauf hin, dass es sich bei der 32 kDa-Bande um ein PhapII-Degradationsprodukt handeln könnte, bei dem ein N-terminaler Teil verloren ging.

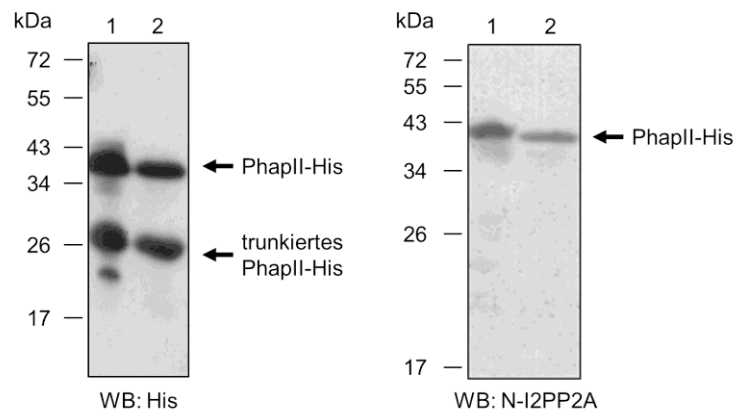


Abb. 22: Western Blot-Analyse des gereinigten PhapII-His-Proteins.

(A) Beide Proteinbanden des rekombinanten PhapII-His konnten unter Verwendung des anti-His₆-Antikörpers in der Eluatfraktion und der Lysatfraktion detektiert werden. (B) Mit dem anti-N-I2PP2A konnte jedoch nur die 42 kDa große Proteinbande in beiden Fraktionen detektiert werden. Spur 1: Gesamtzelllysate nach Induktion, Spur 2: Eluat 2

Im Cytoplasma von *E. coli* ist eine größere Anzahl von Proteasen vorzufinden, so dass hier Protein-Degradation ein häufigeres Problem darstellt als beispielsweise im Periplasma (Swamy und Goldberg, 1982; Talmadge und Gilbert, 1982). Die fehlende Reaktivität der 32 kDa-Bande mit dem anti-I2PP2A-Antikörper könnte auch darauf beruhen, dass die 32 kDa große Proteinvariante eine andere Faltung aufweist. Unter der Annahme, dass diese Hypothese zutrifft, wurde die Proteinexpression bei niedrigen Temperaturen durchgeführt, da unter diesen Bedingungen in *E. coli* eine Reihe von Chaperonen exprimiert werden, die eine korrekte Proteinfaltung unterstützen (Sahdev et al., 2008). In Abb. 23 ist zu sehen, dass trotz Erniedrigung der Expressionstemperatur von 37 °C auf 30 °C bzw. 21 °C die kleinere Proteinform weiterhin gebildet wurde.

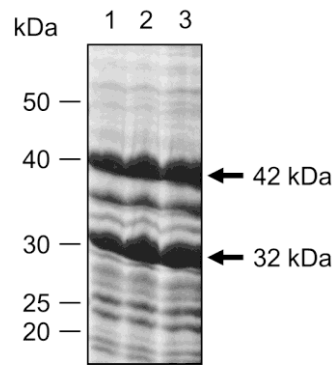


Abb. 23: Veränderung der Expressionsbedingungen für pET22b-phapII.

Die Expression des PhapII-His-Proteins wurde bei 21 °C, 30 °C und 37 °C durchgeführt. *E. coli*-Zellen, transformiert mit pET22b-phapII, wurden zunächst bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3 kultiviert und anschließend in drei Kulturflaschen aufgeteilt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 30 °C bzw. 21 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 inkubiert und Proben nach 2 h (37 °C) bzw. 3,5 h (21 °C und 30 °C) Induktion mit 1 mM IPTG entnommen. Die Gesamtzelllysate nach Induktion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Spur 1: 37 °C, Spur 2: 30 °C und Spur 3: 21 °C.

4.3.2.1 Expression unter osmotischem Stress

Eine weitere Möglichkeit, eine korrekte Faltung zu unterstützen, stellt die Expression unter osmotischem Stress dar (Blackwell und Horgan, 1991). Das Wachstum von Bakterien unter osmotischem Stress und zusätzlich die Anwesenheit von Glycinbetain und Sorbitol haben einen positiven Einfluss auf die Bildung von löslichem und aktivem Protein (Blackwell und Horgan, 1991).

Als Expressionsstämme wurden die *E. coli*-Stämme Rosetta (DE3) pLysS und BL21 (DE3) eingesetzt und das Plasmid pET22b-phapII in diese transformiert. Es wurden zunächst verschiedene Ansätze in kleinem Maßstab in TB-Medium mit 0,5 M Sorbitol, 4 % (v/v) NaCl und 10 mM Betain oder in normalem LB-Medium hergestellt und die Lysate nach der Induktion in der SDS-PAGE aufgetrennt (Kapitel 3.5.2.2). In Abb. 24 ist deutlich zu erkennen, dass die cytoplasmatische Expression von PhapII in beiden *E. coli*-Stämmen erfolgreich war. In BL21 (DE3) ist die Expressionseffizienz in beiden Medien jedoch generell geringer. Der osmotische Stress im TB-Medium scheint allerdings auch die Expressionsleistung beider *E. coli*-Stämme zu beeinträchtigen.

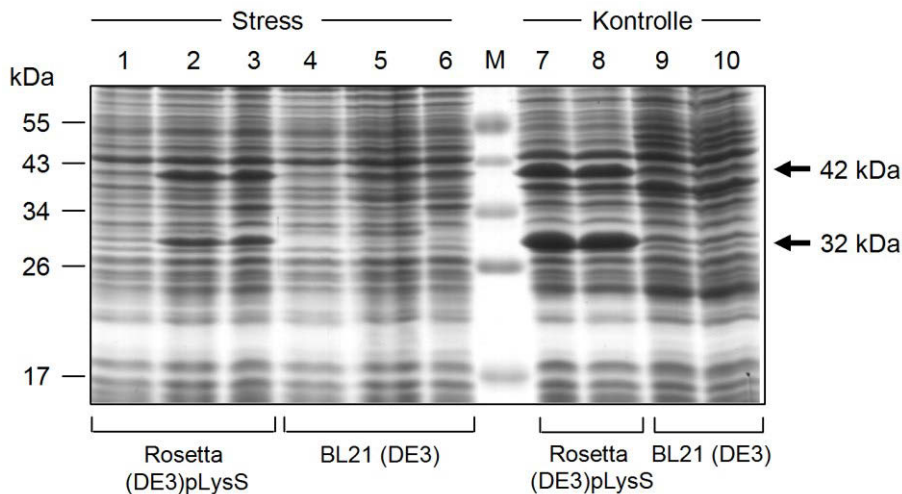


Abb. 24: Expression des PhapII-His-Proteins unter osmotischem Stress.

Den Expressionskulturen wurden nach Erreichen einer OD_{578} von 0,5 zur Erzeugung des osmotischen Stresses 0,5 M Sorbitol, 4 % NaCl und 10 mM Betain zugegeben. Danach wurde bei 28-30 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mM IPTG induziert und für 4 h bei gleicher Temperatur kultiviert. Als Kontrolle diente eine Expressionskultur in LB-Medium, die bei 37 °C inkubiert und 2 h mit 1 mM IPTG induziert wurde. Beide Ansätze wurden mit pET22b-phapII transformierten Rosetta (DE3) pLysS- und BL21 (DE3)-Zellen durchgeführt. Spur 1 bis 6 sind Fraktionen unter Stressbedingungen und Spur 7 bis 10 Fraktionen unter normalen Expressionsbedingungen. Spur 1: Gesamtzelllysate vor Induktion aus Rosetta (DE3) pLysS, Spur 2: Gesamtzelllysate nach Induktion aus Rosetta (DE3) pLysS, Spur 3: Lysat nach Induktion und Zellaufschluss aus Rosetta (DE3) pLysS, Spur 4: Gesamtzelllysate vor Induktion aus BL21 (DE3), Spur 5: Gesamtzelllysate nach Induktion aus BL21 (DE3), Spur 6: Lysat nach Induktion und Zellaufschluss aus BL21 (DE3), Spur 7: Gesamtzelllysate nach Induktion aus Rosetta (DE3) pLysS, Spur 8: Lysat nach Induktion und Zellaufschluss aus Rosetta (DE3) pLysS, Spur 9: Gesamtzelllysate nach Induktion aus BL21 (DE3), Spur 10: Lysat nach Induktion und Zellaufschluss aus BL21 (DE3); M, Marker.

Mit einem anti-I2PP2A-Antikörper, gerichtet gegen einen Abschnitt des C-Terminus (anti-C-I2PP2A), konnte im Western Blot neben dem 42 kDa Protein auch die kleinere Form bei 32 kDa in allen Expressionsbedingungen nachgewiesen werden (Abb. 25). Daneben fanden sich unter normalen Expressionsbedingungen weitere Banden, die vermutlich Degradationsprodukte darstellen.

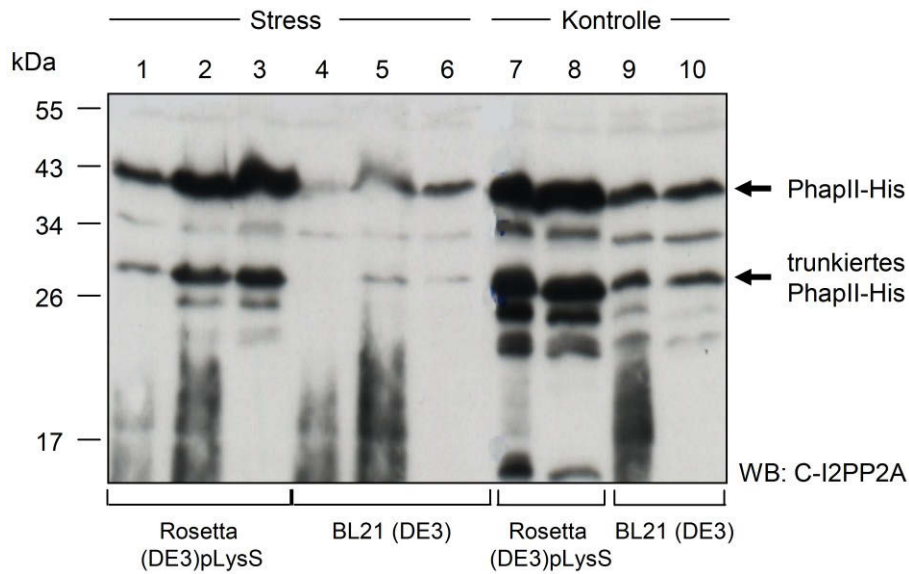


Abb. 25: Western Blot-Analyse des exprimierten PhapII-His-Proteins unter osmotischem Stress.

Die Expressionsfraktionen, gewonnen unter osmotischem Stress und unter Standardbedingungen (Abb. 24), wurden nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Das PhapII-His-Protein wurde mit einem anti-C-I2PP2A-Antikörper nachgewiesen. Spur 1 bis 6 sind Fraktionen gewonnen unter Stressbedingungen und Spur 7 bis 10 Fraktionen gewonnen unter normalen Expressionsbedingungen. Spur 1: Gesamtzelllysate vor Induktion aus Rosetta (DE3) pLysS, Spur 2: Gesamtzelllysate nach Induktion aus Rosetta (DE3) pLysS, Spur 3: Lysat nach Induktion und Zellaufschluss aus Rosetta (DE3) pLysS, Spur 4: Gesamtzelllysate vor Induktion aus BL21 (DE3), Spur 5: Gesamtzelllysate nach Induktion aus BL21 (DE3), Spur 6: Lysat nach Induktion und Zellaufschluss aus BL21 (DE3), Spur 7: Gesamtzelllysate nach Induktion aus Rosetta (DE3) pLysS, Spur 8: Lysat nach Induktion und Zellaufschluss aus Rosetta (DE3) pLysS, Spur 9: Gesamtzelllysate nach Induktion aus BL21 (DE3), Spur 10: Lysat nach Induktion und Zellaufschluss aus BL21 (DE3).

4.3.3 Klonierung von *phapII* mit Stoppcodon in *pET22b* (+)

Um einen negativen Einfluss des C-terminalen His₆-tags auf die Faltung des Proteins auszuschließen, wurde *phapII* einschließlich des Stoppcodons aus dem Konstrukt pASK-IBA5-*phapII* mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *XhoI* herausgeschnitten und in das ebenfalls mit *SacI* und *XhoI* verdaute pET22b-*phapII*-Konstrukt kloniert. Nach einer Plasmidpräparation wurden die positiven Klone mit Hilfe einer Sequenzierung mit T7-Primern auf das eingefügte Stoppcodon hin untersucht.

4.3.4 Expression und Reinigung von PhapII ohne tag

Die Expression des PhapII-Proteins ohne C-terminalen His₆-tag erfolgte analog dem His-getaggen PhapII-Protein und führte neben der 42 kDa-Proteinbande auch zu der kleineren Proteinvarianten bei 32 kDa (Abb. 26). Darüber hinaus reagierte eine 28 kDa-

Polypeptidbande mit beiden Antikörpern. Der C-terminale His₆-tag scheint somit keinen Einfluss auf die Stabilität bzw. Faltung des Proteins zu haben.

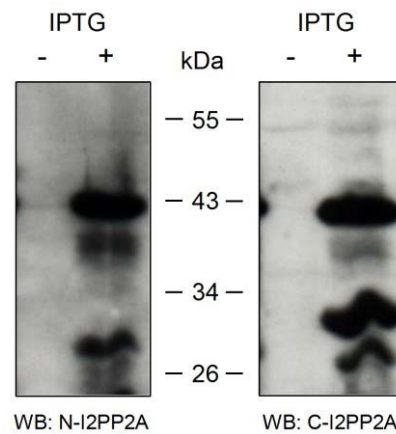


Abb. 26: Western Blot-Analyse des exprimierten PhapII ohne His₆-tag.

Die Gesamtzelllysate vor und nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Unter Verwendung eines anti-C-I2PP2A-Antikörpers konnten eine 42 kDa und eine 32 kDa große Proteinform detektiert werden (rechts), mit dem anti-N-I2PP2A-Antikörper jedoch nur die größere Form (links). Eine 28 kDa Polypeptidbande reagierte mit beiden Antikörpern. – IPTG, Gesamtzelllysate vor der Induktion; + IPTG, Gesamtzelllysate nach der Induktion.

4.3.4.1 Reinigung von PhapII über die Poly-L-Lysin-Agarose-Chromatographie

Die Reinigung des ungetaggtten PhapII-Proteins wurde nach einem modifizierten Protokoll von Li et al. (1996) durchgeführt, um die Isolierung nur der 42 kDa großen Proteinform zu ermöglichen. Zelllysate einer Expressionskultur wurde zunächst auf eine Poly-L-Lysin-Agarose-Säule aufgetragen (Kapitel 3.5.2.3 und 3.5.13.1). Bei Poly-L-Lysin handelt es sich um ein kationisches Polymer, das unter anderem negativ geladene Proteine binden kann, die anschließend mit einem Salzgradienten eluiert werden können. Das ungetaggte hochexprimierte saure PhapII-Protein im Zelllysate sollte aufgrund seiner negativen Ladung mit dem Polymer interagieren und so an der Säule akkumulieren. Unspezifisch gebundene Proteine wurden von der Säule gewaschen und PhapII mit einem stufenweisen NaCl-Gradienten (0,6; 0,7; 0,8; 0,9 und 1 M) von der Säule eluiert (Abb. 27A). Die verschiedenen Fraktionen (Lysat, Pellet, Rohextrakt, Durchlauf und Eluate) wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 27B). Wie aus dem Diagramm zu entnehmen ist, wurde mit zunehmender NaCl-Konzentration kontinuierlich Protein von der Säule eluiert. Das SDS-Gel einzelner Eluatfraktionen zeigte, dass bei einer NaCl-Konzentration von 0,6-0,7 M bevorzugt das 42 kDa große PhapII-Protein von der Säule eluiert und mit zunehmender NaCl-Konzentration die kleinere Proteinvariante von PhapII

die Säule verließ (Abb. 27B). Das schließt darauf hin, dass beide PhapII-Varianten z. T. unterschiedliche Ladungen aufweisen. Nichtsdestotrotz war die Entfernung der 32 kDa großen Proteinform von PhapII nicht vollständig.

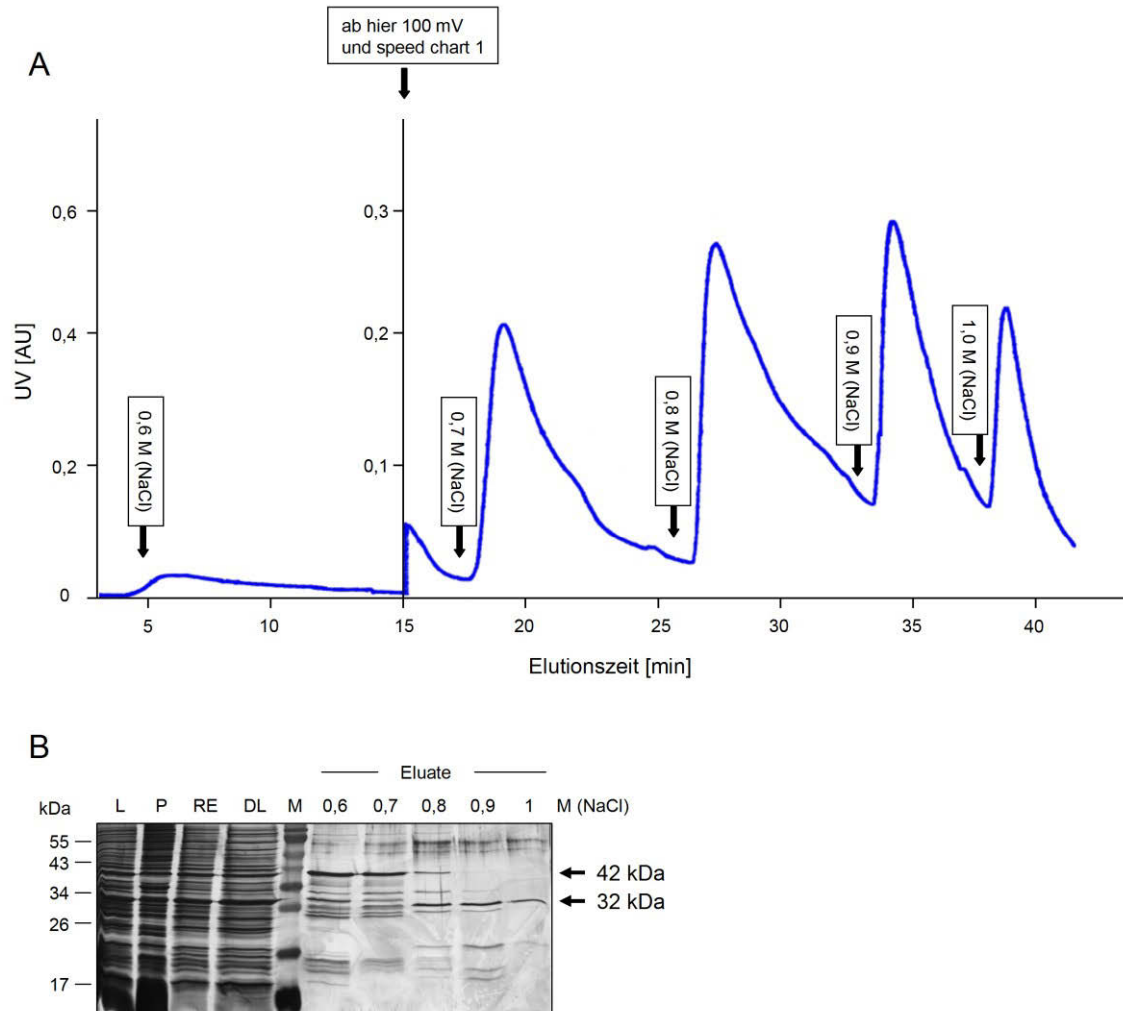


Abb. 27: Auftrennung der beiden Proteinformen über Poly-L-Lysin-Agarose-Chromatographie.

500 ml-Expressionskultur wurden nach dem Aufschluss auf die Poly-L-Lysin-Agarose-Säule aufgetragen, unspezifisch gebundene Proteine wurden von der Säule gewaschen. Danach wurde das PhapII-Protein mit einem stufenweisen NaCl-Gradienten (0,6-1,0 M) mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min von der Säule eluiert, das mit einem an die Säule angeschlossenen Photometer bei 280 nm detektiert wurde. **(A)** Elutionsprofil; **(B)** SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung der Reinigungsfraktionen. L, Lysat nach Induktion und Zellaufschluss; P, Pellet nach Induktion und Zellaufschluss; RE, Rohextrakt; DL, Durchlauf; M, Marker.

Zur weiteren Isolierung der 42 kDa-Proteinform wurden die Eluate, die mit 0,6-0,7 M NaCl gewonnen wurden, gepoolt, konzentriert und anschließend auf eine Sephacryl S 200 26/100 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Trennung ergab einen Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen von 190 ml und zwei weitere Peaks bei 232 ml und 257 ml (Abb. 28A).

In allen Fraktionen wurde die 42 kDa große Proteinform mit kleineren Proteinvarianten nachgewiesen, wobei in der ersten Fraktion größtenteils die 42 kDa große Proteinform vorlag (Abb. 28B). Letztendlich konnte keine vollständige Isolierung des 42 kDa großen PhapII-Proteins erreicht werden.

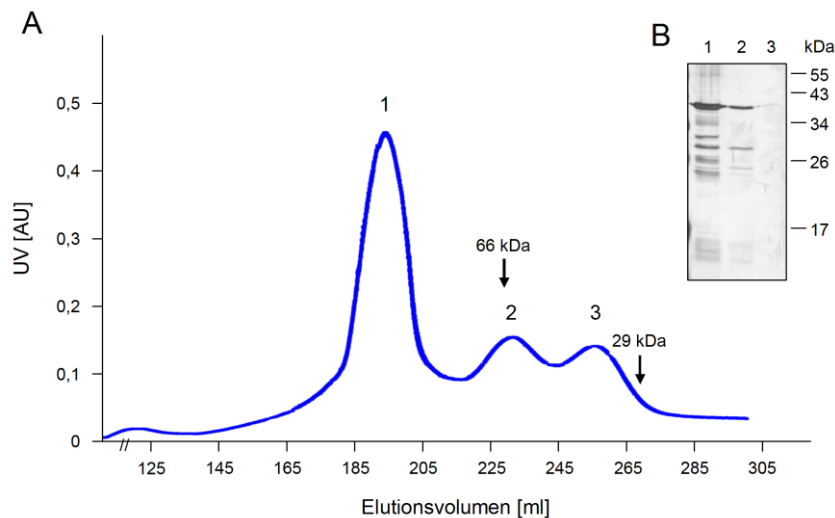


Abb. 28: Analytische Gelfiltration von PhapII mittels Sephacryl S 200 26/100.

Es wurden die Fraktionen, die bei 0,6-0,7 M NaCl von der Poly-L-Lysin-Agarose-Chromatographie eluiert worden waren, auf einer Sephacryl S 200 26/100-Gelfiltrationssäule mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min aufgetrennt. (A) Elutionsprofil. Dargestellt sind die Absorptionswerte in AU gegen das Elutionsvolumen in ml. Photometer: 280 nm. Mit Pfeilen sind die Elutionspositionen der Marker-Proteine dargestellt (66 kDa Albumin; 29 kDa Carboanhydrase). (B) Die mit den Signalmaxima korrespondierenden Fraktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt.

4.3.4.2 Mutation eines möglichen zweiten Translationsstartpunktes

Einige Nukleotidsequenzen, insbesondere von eukaryotischen Proteinen, können bei der Expression in Bakterien von deren Ribosomen als Translationsstartpunkt erkannt werden. Die Sequenz, die etwa drei bis zehn Nukleotide vor dem Translationsstartpunkt liegt, wird als Shine-Dalgarno-Sequenz bezeichnet und besitzt das Motiv AGGAGG. In humanem PhapII könnte der Sequenzbereich AAGAGG (208-213 bp) als eine Shine-Dalgarno-Sequenz und ATTG als Translationsstartpunkt (219-222 bp) erkannt werden (Abb. 29). Die errechnete molare Masse dieses Translationsproduktes wäre 23,6 kDa und könnte der in der SDS-PAGE beobachteten Bande von 32 kDa entsprechen, da das PhapII-Protein in SDS-Polyacrylamidgelen stets höher läuft.

Um diesen möglicherweise eintretenden, ungewollten Translationsvorgang zu unterbinden, wurde die vermeintliche Startsequenz ATTG mittels einer ortsgerichteten Mutagenese (Kapitel 3.1.1.10) in GCTC umgewandelt, ohne dabei die

Aminosäurecodierung zu ändern. Die PCR wurde mit den Primern Set dstart intern fwd und T7 ter durchgeführt. Die positiven Klone wurden durch Restriktionsverdau mit *SacI* und anschließender Sequenzierung überprüft. Eine Kontrollexpression in Rosetta (DE3) pLysS ergab auch unter diesen Bedingungen die Ausbildung der kleineren Proteinvariante von PhapII (Daten nicht gezeigt).

	205	210	215	220	225	230	235 (bp)
pET 22b-phapII (ohne Tag):	5'-	CAG	AAGAGG	TCAGA	ATTG	ATCGCCAAAATCCCA-	3'
pET 22b-phapII (ohne Tag, mut):	5'-	CAG	AAGAGG	TCAGA	<u>GCTC</u>	ATCGCCAAAATCCCA-	3'

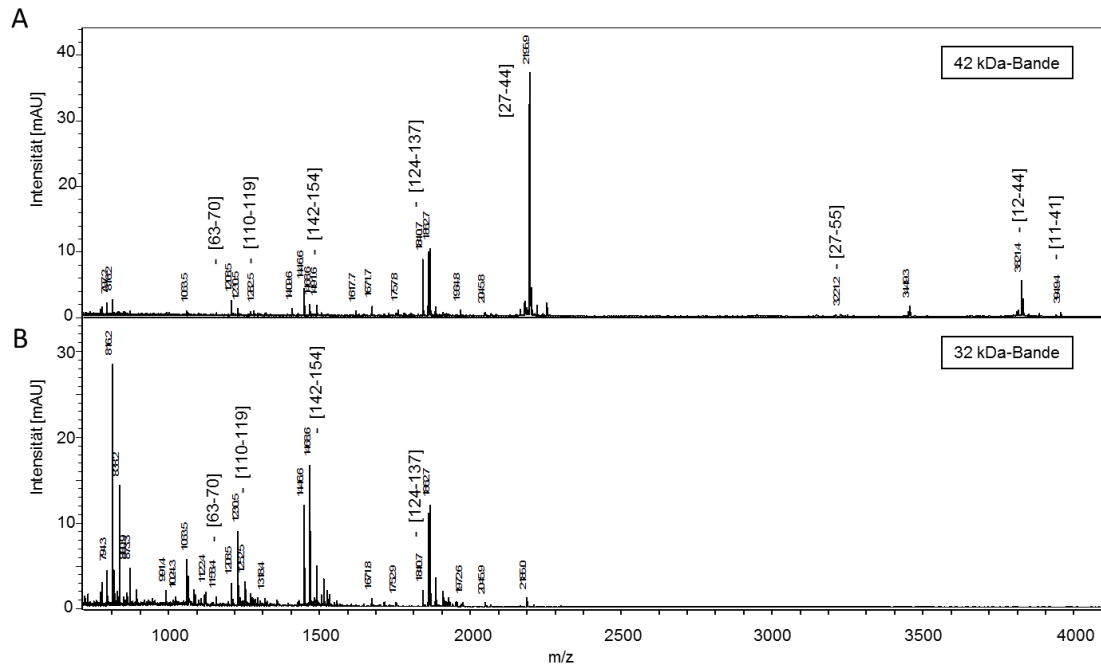
Abb. 29: Mutation des sekundären Translationsstartpunktes.

Dargestellt ist ein Sequenzabschnitt des pET22b-phapII (ohne *tag*)-Konstrukts, der ein Motiv für eine Shine-Dalgarno-Sequenz und den Translationsstartpunkt beinhaltet. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde die vermeintliche Startsequenz ATTG (Position 219-222 bp) in GCTC umgewandelt. Das neue Konstrukt wurde in pET22b-phapII (ohne *tag*, mut) umbenannt. Dabei sind die Shine-Dalgarno-Sequenzen rot eingefärbt und die Startpunkte fett gedruckt. Die in der jeweiligen Mutagenese eingeführten Substitutionen sind unterstrichen.

4.3.4.3 Massenspektrometrische Analyse von PhapII-His

Zur endgültigen Charakterisierung der kleineren PhapII-Form und der Identifizierung von eventuellen Spaltstellen wurde von der 42 kDa- und der 32 kDa-Form von PhapII-His eine MALDI-ToF-Massenanalyse durchgeführt (Kapitel 3.5.5). Bei der größeren Proteinform wurden am N-Terminus Peptide detektiert, die bei der kleineren Proteinvariante fehlten: 2196,9 Da [aa 27-44], 3221,2 Da [aa 27-55], 3821,4 Da [aa 12-44], 3949,4 Da [aa 11-41] (Abb. 30A und B). Darüber hinaus machten das Fehlen von Trypsinschnittstellen und die große Anzahl der sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat am C-Terminus die massenspektrometrische Untersuchung ab der Aminosäure 210 unmöglich (Abb. 30C). Der Vergleich der detektierten Peptidpeaks im Spektrum der beiden Proteinformen weist auf eine Spaltstelle zwischen der Aminosäure (aa) 44 und 63 hin. Eine exakte Bestimmung der Spaltstelle war jedoch nicht möglich.

Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass es sich bei der kleineren Proteinbande um ein N-terminal trunkiertes Fragment der 42 kDa-Form handelt. Diese Annahme wird auch durch den Befund gestützt, dass die 32 kDa-Bande mit einem anti-His-Antikörper, einen gegen einen C-terminalen Abschnitt von PhapII gerichteten Antikörper, nicht jedoch mit einem gegen einen N-terminalen Abschnitt von PhapII gerichteten Antikörper erkannt wurde (vgl. Abb. 22 und Abb. 25).



C 42 kDa-Bande: nachgewiesene Peptidsequenzen von PhapII-His

```

1 MSAQAAKVSKELNSNHDGADETSEKEQEAIEHIDEVQNEIDRLNEQ
49 ASEEILKVEQKYNKLRQPFFQKRSELIAKIPNFWVTTFVNHPQVSALLG
98 EDEEALHYLRVEVTEFEDIKSGYRIDFYFDENPYFENKVLSKEFHLN
147 ESGDPSSKSTEIKWKSGKDLTKRSSQTQNKASRKRQHEEPESFTWFTD
196 HSDAGADELGEVIKDDIWPNPLQYYLVPMDDEEGEGEEDDDDDDEE
243 EGLEIDEEGDEDEGEEDDDDEGEEGEEDGEDDLEHHHHHHH

```

32 kDa-Bande: nachgewiesene Peptidsequenzen von PhapII-His

```

1 MSAQAAKVSKELNSNHDGADETSEKEQEAIEHIDEVQNEIDRLNEQ
49 ASEEILKVEQKYNKLRQPFFQKRSELIAKIPNFWVTTFVNHPQVSALLG
98 EDEEALHYLRVEVTEFEDIKSGYRIDFYFDENPYFENKVLSKEFHLN
147 ESGDPSSKSTEIKWKSGKDLTKRSSQTQNKASRKRQHEEPESFTWFTD
196 HSDAGADELGEVIKDDIWPNPLQYYLVPMDDEEGEGEEDDDDDDEE
243 EGLEIDEEGDEDEGEEDDDDEGEEGEEDGEDDLEHHHHHHH

```

Abb. 30 MALDI-ToF-Analyse von PhapII-His.

Die 42 kDa- (A) und die 32 kDa-Proteinbande (B) wurden mit Trypsin verdaut und anschließend einer MALDI-ToF-Analyse unterzogen. Massenpeaks sind in Abhängigkeit von Masse-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetragen. In der Aminosäuresequenz von PhapII-His sind die massenspektrometrisch nachgewiesenen Peptide für die 42 kDa- und die 32 kDa-Bande markiert (C).

4.3.5 Konstruktion von *phapII* in *pQE-30*

Aufgrund des Auftretens einer kleineren Proteinvariante, das auch durch verschiedene Versuchsansätze nicht verhindert werden konnte, war der pET22b(+)-Vektor nicht geeignet für die Herstellung von homogenem PhapII. Als mögliche Alternative erschien die Expression in dem pQE-30-Vektor des QIAexpress-Systems (Fa. Qiagen, Hilden). Der pQE-30-Vektor basiert auf dem T5-Promotorsystem, das aus einem Phagen-T5-Promotor

und zwei *lac* Operator-Sequenzen besteht, die zu einer erhöhten Bindung des *lac*-Repressors führen und so effizient die Aktivität des T5-Promotors unterdrücken können (Stüber und Bujard, 1982). Der Phagen T5-Promotor wird dabei durch die *E. coli* eigene RNA-Polymerase erkannt, die allerdings im Vergleich zur T7-RNA-Polymerase eine 5-fach niedrigere Aktivität aufweist (Chamberlin und Ring, 1973; Golomb und Chamberlin, 1974; von Gabain und Bujard, 1977). Die daraus resultierende verlangsamte Proteinexpression ermöglicht eine verbesserte Faltung des rekombinanten Proteins. Überdies bietet der Vektor die Möglichkeit der Expression von Proteinen mit N-terminalem His₆-tag, die dann mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden können.

Für die Klonierung in den pQE-30-Vektor wurde das *phapII*-Gen zunächst über eine PCR mit den Primern Phap fwd BamHI und Phap rev HindIII aus dem pCR4-*phapII*-Konstrukt amplifiziert und nach einer präparativen Reinigung in den Zwischenvektor pCR-Blunt II-Topo *blunt* kloniert (Abb. 31A).

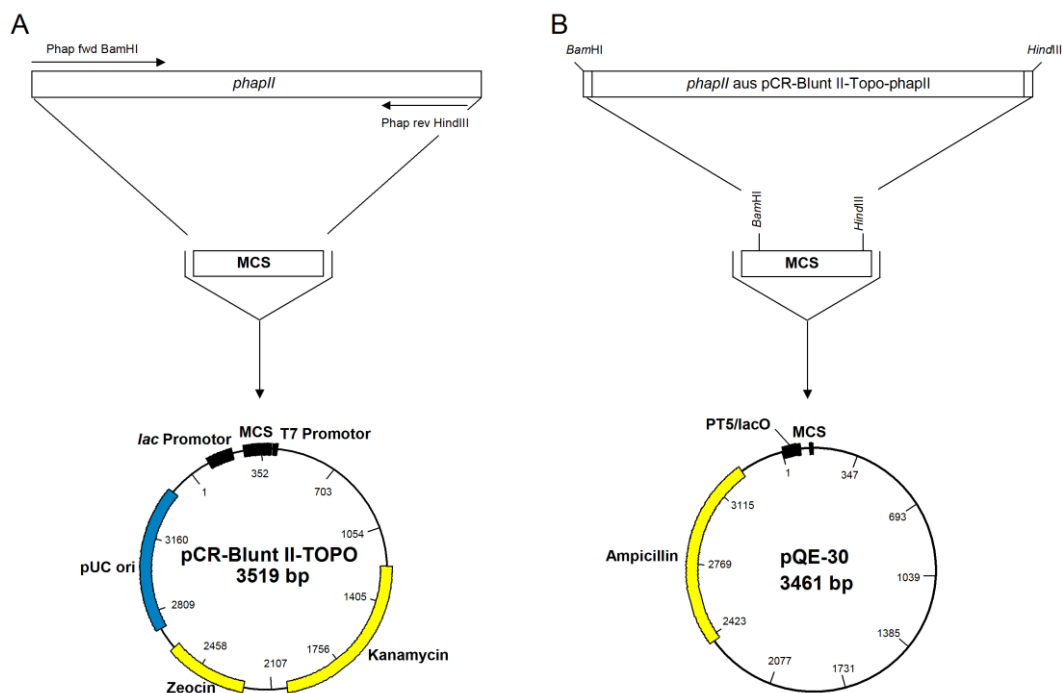


Abb. 31: Strategie zur Klonierung von *phapII* in den pQE-30-Vektor.

(A) Klonierung des *phapII*-PCR-Produktes in den Zwischenvektor pCR-Blunt II-Topo. Die *phapII*-DNA wurde in einer PCR-Reaktion mit Hilfe der Primer Phap fwd BamHI und Phap rev HindIII amplifiziert, gereinigt und in den pCR-BluntII-Topo-Vektor *blunt* kloniert. MCS, Multiple Cloning Site; pUC ori, ColE1-Replikationsursprung; Kanamycin, Kanamycinresistenzgen; Zeocin, Zeocinresistenzgen. (B) Konstruktion des Expressionsvektors pQE-30 zur Herstellung von N-terminal His₆-getagtem PhapII-Protein. Das *phapII*-Gen wurde über einen *Bam*HI/*Hind*III-Restriktionsverdau aus dem Zwischenkonstrukt pCR-BluntII-Topo herausgeschnitten und in den ebenfalls *Bam*HI/*Hind*III verdauten Vektor pQE-30 kloniert. MCS, Multiple Cloning Site; PT5, T5 Promotor; *lac* O, *lac*-Operator; Ampicillin, Ampicillinresistenzgen.

Positive Klone wurden einer Plasmidpräparation unterzogen, das Insert über einen *Bam*HI- und *Hind*III-Restriktionsverdau aus dem Zwischenvektor herausgeschnitten und in den ebenfalls *Bam*HI/*Hind*III verdauten pQE-30-Vektor kloniert (Abb. 31B). Die Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft und anschließend in den *E. coli*-Stamm XL1 Blue transformiert. Dieser *E. coli*-Stamm besitzt eine *lac*^q-Mutation und produziert zur Unterdrückung der extrem hohen Transkriptionsrate, die durch den T5-Promotor initiiert wird, ausreichende Mengen an *lac*-Repressor. Die Expression des rekombinanten Proteins wird durch die Zugabe von IPTG induziert, das an das *lac*-Repressorprotein bindet und dieses inaktiviert (Bullock et al., 1987).

4.3.6 Expression mit dem pQE-30-Vektor und Reinigung von His-PhapII

Die Expression von His-PhapII wurde wie in Kapitel 3.5.2.1 beschrieben durchgeführt und das Protein über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die verschiedenen Reinigungsfractionen wurden mittels einer SDS-PAGE und einer anschließenden Western Blot-Analyse überprüft.

Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel konnte keine durch IPTG induzierbare Proteinbande bei 45 kDa nachgewiesen werden (Abb. 32A). Die hohe Hintergrundfärbung in den Eluatfraktionen ist vermutlich auf unspezifische Bindungen an die Ni-NTA-Säule zurückzuführen. Diese ist besonders ausgeprägt sichtbar, wenn die Expression des rekombinanten Proteins unterhalb der Expression von zelleigenen Proteinen liegt.

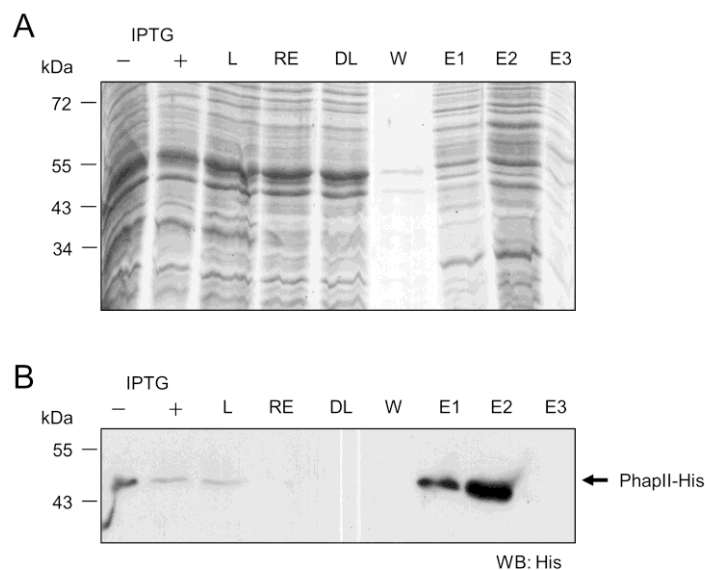


Abb. 32: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 32: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse des N-terminal His₆-getaggtten PhapII-Proteins.

Die Expression des His-PhapII wurde mit pQE-30-phapII transformierten XL1 Blue-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert und in 1x TBS, 1 % Lysozym und Proteaseinhibitor mit anschließender Ultraschallbehandlung lysiert. Der Rohextrakt wurde einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgetrennt und die gebundenen Proteine mittels 1x TBS, 250 mM Imidazol eluiert. 500 µl-Eluatfraktionen wurden gesammelt. (A) SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der verschiedenen Fraktionen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie. (B) Korrespondierende Western Blot-Analyse des gereinigten His-PhapII-Proteins. Unter Verwendung eines anti-His-Antikörpers konnte eine 45 kDa große Proteinbande detektiert werden. –IPTG, Gesamtzelllysate vor Induktion aus XL1 Blue; +IPTG, Gesamtzelllysate nach Induktion aus XL1 Blue; L, Lysat nach Induktion und Zellaufschluss; RE, Rohextrakt; DL, Durchlauf; W, Waschen; E1- E3, Eluatfraktionen.

Mittels der Western Blot-Analyse konnte dennoch eine Bande im Bereich von 45 kDa in den Eluatfraktionen detektiert werden (Abb. 32B). In Lysaten IPTG-induzierter und nicht-induzierter Bakterienzellen konnte His-PhapII ebenfalls nachgewiesen werden. Die geringe Expression des rekombinanten Proteins ist wahrscheinlich auf den verwendeten *E. coli*-Stamm XL1 Blue zurückzuführen. XL1 Blue kann zwar neben der Plasmidamplifikation auch für die Expression von nicht-toxischen Proteinen eingesetzt werden, ist aber weniger effizient. Auch die Expressionsregulation ist weniger stringent als in anderen *E. coli*-Stämmen, die z. B. mit dem pREP4-Plasmid ausgestattet sind. Folglich führt dies zu einer Hintergrundexpression des rekombinanten Proteins, die bereits ohne Induktion auftritt (Qiagen, 2003). Für Proteine, die keine cytotoxischen Effekte hervorrufen, wie PhapII, ist diese Basalexpression („leaky“ expression) vernachlässigbar.

4.3.6.1 Expression von His-PhapII in verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Zur Erhöhung der Expressionsrate und Minimierung der Basalexpression in dem pQE-30-System, wurde das PhapII-Konstrukt in den *E. coli*-Stamm M15[pREP4] transformiert. M15[pREP4] besitzt das Plasmid pREP4, das konstitutiv das *lac*-Repressorprotein exprimiert, welches die T5-Promotor-vermittelte hohe Transkriptionsrate reguliert (Qiagen, 2003). Darüber hinaus wurde das pQE-30-phapII-Konstrukt in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) CodonPlus-RIL transformiert. Dieser Stamm erlaubt die Expression von Genen, die für tRNAs von vier seltenen Codons codieren, besitzt jedoch nicht das pREP4-Plasmid (Carstens, 2003). So wurden zunächst die BL21 (DE3) CodonPlus-RIL kompetenten Zellen mit pREP4 transformiert, positive Klone weiter kultiviert und chemisch kompetente Zellen hergestellt. Das pQE-30-phapII wurde anschließend in BL21 (DE3) CodonPlus-RIL[pREP4] transformiert und die Expression überprüft. Eine SDS-PAGE der Bakterienlysate der induzierten und nicht induzierten M15[pREP4] bzw. BL21 (DE3) CodonPlus-RIL[pREP4] ist in Abb. 33 dargestellt. Auch mit Hilfe dieser

Expressionsstämme konnte keine signifikante Verbesserung der PhapII-Expression erzielt werden. Die Überprüfung verschiedener Klone war ebenfalls erfolglos (Daten nicht gezeigt). Obgleich das pQE-30-System zu keiner kleineren Proteinvariante von His-PhapII führte, ist es für die Expression von PhapII nicht geeignet.

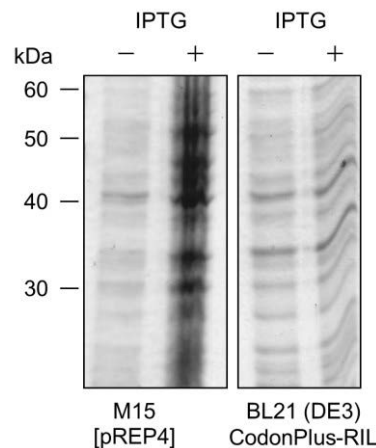


Abb. 33: Testexpression des pQE-30-phapII-Konstrukts in *E. coli* M15 [pREP4] und BL21 (DE3) CodonPlus-RIL [pREP4].

Die Bakterienzellen wurden bei 37 °C nach Erreichen ihrer logarithmischen Wachstumsphase mit 1 mM IPTG induziert. Nach 2 h wurden die *E. coli*-Kulturen geerntet und lysiert. Aliquots von Gesamtzelllysaten vor (-IPTG) und nach IPTG-Induktion (+IPTG) wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert.

4.3.7 Konstruktion von *phapII* in pET45b (+)

In den bisherigen Untersuchungen bot das pET-Expressionssystem in Bezug auf die Proteinausbeute die besseren Voraussetzungen, wobei mit dem pQE-System das Problem einer kleineren Proteinform behoben werden konnte. Ausgehend von diesen Erkenntnissen schien eine Klonierung von *phapII* in den pET45b(+)-Vektor als eine mögliche Alternative: Hier wird eine effiziente Expression des Proteins mit einem N-terminalem His-tag aufgrund einer starken T7 RNA-Polymerase-Aktivität ermöglicht.

Zunächst wurde das Plasmid pIBA-ASK5-PhapII mit dem Restriktionsenzym *Acc65I* linearisiert und anschließend die 5'-Überhänge zur Erzeugung von glatten Enden mit Hilfe des Klenow Fragments aufgefüllt. Nach einem darauf folgenden Verdau mit dem Restriktionsenzym *XhoI* wurde die *phapII*-DNA aus dem Vektorkonstrukt isoliert und nach Reinigung in den mit *Ecl136II/XhoI* geschnittenen Vektor pET45b(+) kloniert (Abb. 34). Vektorkonstrukte von positiven Klonen wurden über eine Plasmidpräparation isoliert, überprüft und in den Expressionsstamm Rosetta (DE3) pLysS transformiert.

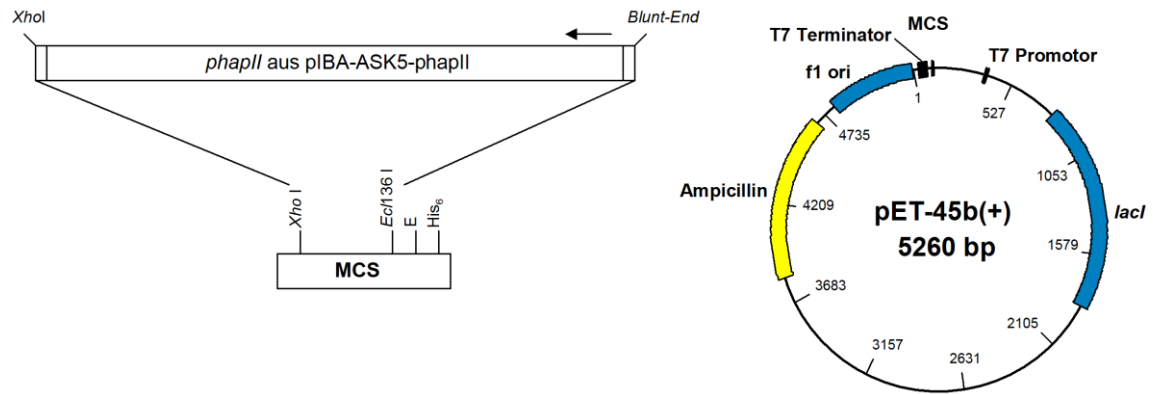


Abb. 34: Schematische Darstellung des Konstrukts pET45b-phapII.

Das Plasmid pIBA-ASK5-PhapII wurde zunächst mit *Acc65I* linearisiert und die 5'-Überhänge mit Klenow Fragment aufgefüllt. Nach weiterer Restriktion mit *XhoI* wurde die *phapII*-DNA aus dem Vektor isoliert und in den *Eco136II/XhoI* geschnittenen Vektor pET-45(+) kloniert. MCS, Multiple Cloning Site; f1 ori, Replikationsursprung des Bakteriophagen f1; Ampicillin, Ampicillinresistenzgen; *lacI*, Repressor des *lac*-Operons; E, Enterokinaseschnittstelle.

4.3.8 Expression und Reinigung von PhapII mit N-terminalem His-tag

Nach erfolgreicher Expression (Abb. 35A) konnte mittels Western Blot-Analyse (Abb. 35B) mit dem anti-His₆-Antikörper eine 45 kDa Bande sowie deutlich schwächere Banden bei 40 kDa, 30 kDa und 28 kDa detektiert werden.

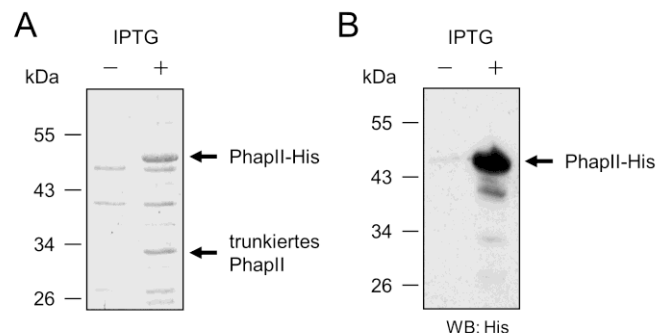


Abb. 35: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von exprimiertem His-PhapII.

Mit dem Vektor pET45b-phapII transformierte *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS wurden bei 37 °C nach Erreichen ihrer logarithmischen Wachstumsphase mit 1 mM IPTG induziert. Nach 2 h wurden die *E. coli*-Kulturen geerntet und lysiert. (A) SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Aliquots von Gesamtzelllysaten vor und nach IPTG-Induktion. (B) Western Blot. Nachweis des His-PhapII-Proteins mit anti-His₆-Antikörper. -IPTG, Gesamtzelllysate vor Induktion; +IPTG, Gesamtzelllysate nach Induktion.

Die starke 45 kDa große Bande konnte überdies während der Proteinreinigung über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie angereichert werden (Abb. 36).

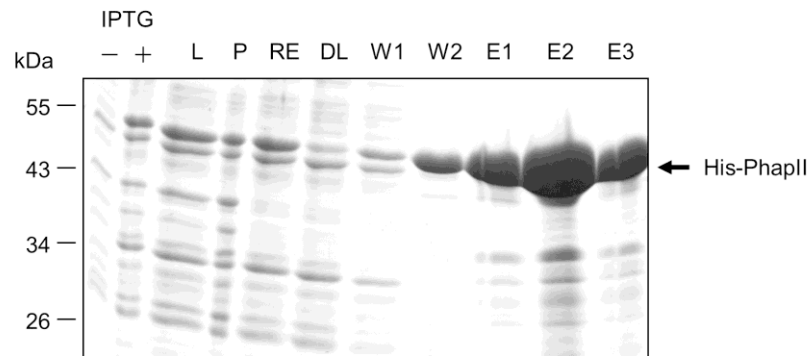


Abb. 36: Ni-NTA-Affinitätschromatographie von Lysat aus His-PhapII exprimierenden Rosetta (DE3) pLysS.

Das Zellpellet von *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, transformiert mit dem Vektor pET45b-phapII und induziert für 2 h bei 37 °C mit 1 mM IPTG, wurde in 1x TBS, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,5 % Triton X-100, 100 µg/ml Lysozym und Proteaseinhibitor mit anschließender Ultraschallbehandlung lysiert und danach einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie unterzogen. Die Säule wurde mit Waschpuffer (1x TBS, 300 mM NaCl, 10 mM, 20 mM, 30 mM bzw. 40 mM Imidazol) mit zunehmender Imidazolkonzentration gewaschen und das gebundene Protein mit 1x TBS, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol in je 1 ml-Fraktionen eluiert. Die Reinigungsfractionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. -IPTG, Gesamtzelllysate vor Induktion; +IPTG, Gesamtzelllysate nach Induktion; L, Lysat nach Induktion und Zellaufschluss; P, Pellet nach Induktion und Zellaufschluss; RE, Rohextrakt; DL, Durchlauf; W1, 1. Waschfraktion mit 20 mM Imidazol; W2, 2. Waschfraktion mit 40 mM Imidazol; E1-E3, Eluate.

Zur Abspaltung des N-terminalen His₆-tags wurde in das *phapII*-Gen eine Thrombinschnittstelle eingebaut, indem eine PCR mit pET45b-phapII als *Template* und den Oligonukleotidprimern fwd Age Thrombin Set BamHI und rev XhoI Set durchgeführt wurde. Das gereinigte PCR-Produkt und das pET45b-phapII-Konstrukt wurden mit *AgeI* und *XhoI* verdaut; anschließend die gewünschten Fragmente gereinigt und ligiert (Abb. 37A). Die Expression der Proteine positiver Klone wurde mittels SDS-PAGE überprüft und His-PhapII über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Daten nicht gezeigt). Der His₆-tag konnte nach einer Inkubation für 5 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C vollständig entfernt werden (Abb. 37B).

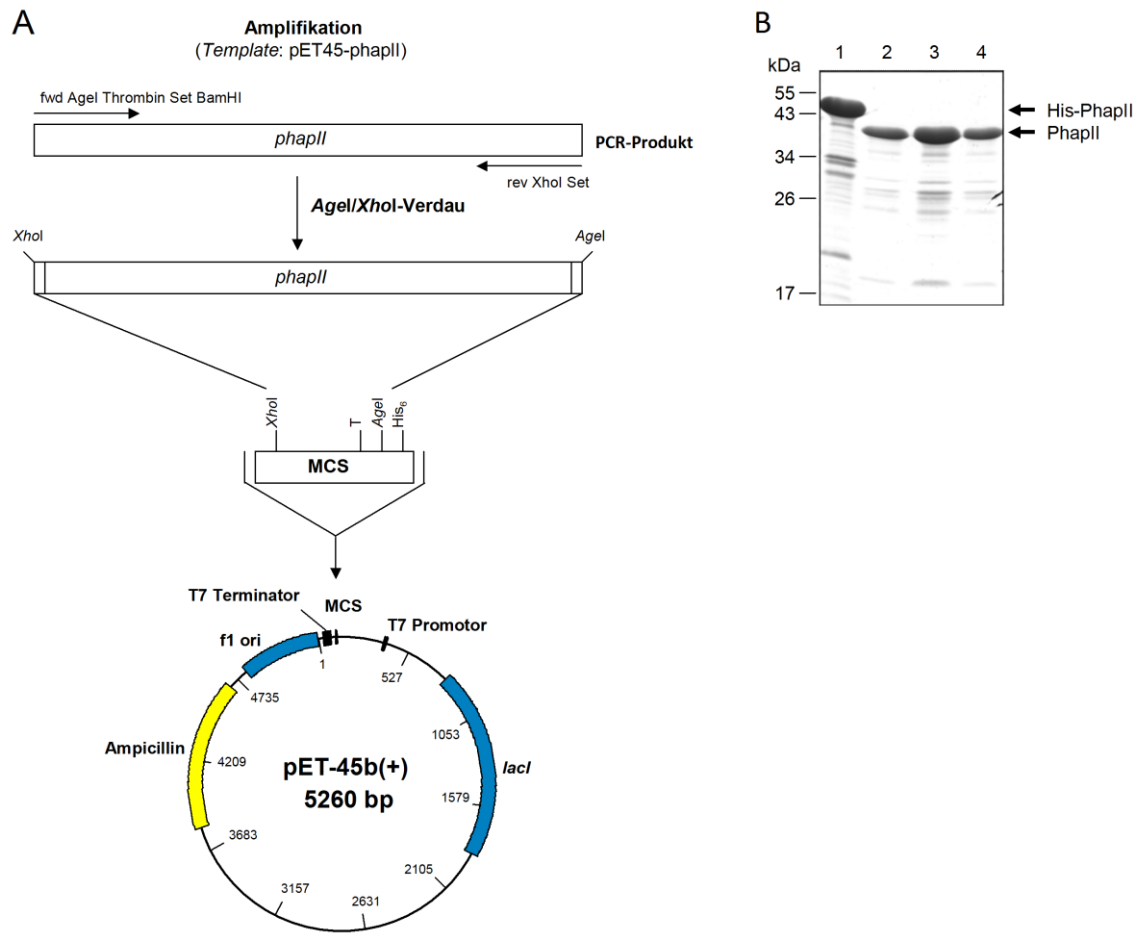


Abb. 37: Strategie zur Integration einer Thrombinschnittstelle in das Konstrukt pET45b-phapII und Überprüfung der His₆-tag-Abspaltung.

(A) Es wurde zwischen dem *phapII*-Gen und dem His₆-tag eine Sequenz für eine Thrombinschnittstelle eingefügt, indem eine PCR mit den Primern fwd AgeI Thrombin Set BamHI und rev XhoI Set durchgeführt wurde. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Agel und XhoI verdaut und in den ebenfalls mit Agel/XhoI geschnittenen Vektor pET45b-phapII kloniert. MCS, Multiple Cloning Site; f1 ori, Replikationsursprung des Bakteriophagen f1; Ampicillin, Ampicillinresistenzgen; lacI, Repressor des lac-Operons; T, Thrombin-Schnittstelle. (B) Das His-PhapII-Protein wurde nach seiner affinitätschromatographischen Reinigung mit Thrombin verdaut. Dieser Verdau erfolgte bei Raumtemperatur für 5 h bzw. über Nacht bei 4 °C und führte zur Abspaltung des His₆-tags. Anschließend wurde der Verdau mittels SDS-PAGE überprüft. Spur 1: His-PhapII unverdaut, Spur 2: Thrombinverdau bei RT, 5h, Spur 3: Thrombinverdau bei 4 °C, über Nacht, Spur 4: PhapII, His₆-tag über Ni-NTA-Agarose entfernt.

4.3.8.1 Reinigung von PhapII über Superdex 75 26/60

Zur weiteren Reinigung des PhapII-Proteins wurde eine Gelfiltrationschromatographie über eine Superdex 75 26/60 Säule (Kapitel 3.5.13.3) durchgeführt. Das Chromatogramm zeigt einen einzelnen Peak mit einem Maximum in Fraktion 18-19 (nach 114-115 ml) (Abb. 38A). PhapII verlässt die Säule ab einem Elutionsvolumen von 100 ml bis 127 ml. Einzelne Fraktionen dieses Bereiches wurden mittels SDS-PAGE untersucht und ergaben,

dass in allen Fraktionen PhapII mit einer apparenten molaren Masse von 42 kDa sowie verschiedenen Degradationsprodukten enthalten war (Abb. 38B).

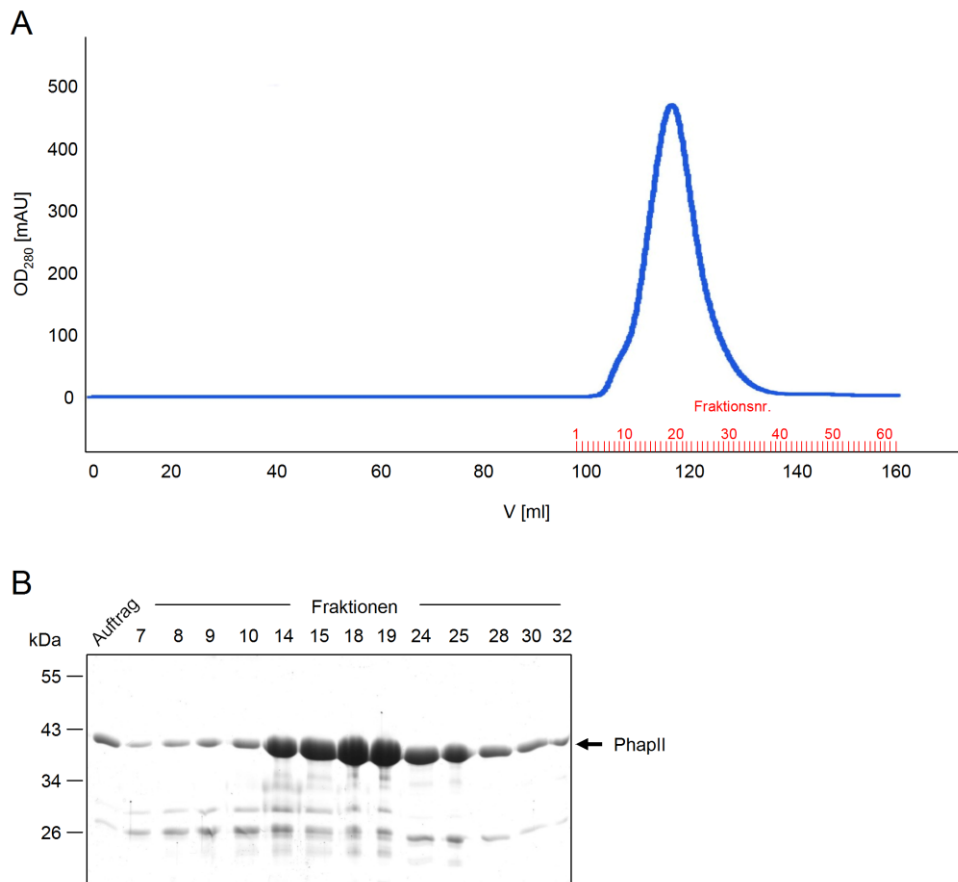


Abb. 38: Analytische Gelfiltration an Superdex 75 26/60.

(A) Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatographie von PhapII mittels Superdex 75 26/60 detektiert bei 280 nm. Der Lauf wurde bei 4 °C mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. Zunächst wurden ca. 15 mg His-PhapII mit Thrombin verdaut, der His₆-tag entfernt und anschließend auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Säule wurde mit Laufpuffer (20 mM Hepes pH 7,0, 150 mM NaCl) eluiert. Die ersten durch die Säule gepumpten Fraktionen im Umfang von 0,33 Säulenvolumen wurden verworfen und die nachfolgenden Eluate bis zu einem konstant niedrigen UV-Absorptionssignal nahe dem Nullwert in 1 ml-Fraktionen gesammelt. Dargestellt sind die Absorptionswerte in mAU gegen das Elutionsvolumen in ml. (B) SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung von Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie.

4.3.8.2 Reinigung von PhapII über Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration an Superdex 75 26/60

Da auch die Gelfiltrationsanalyse zu einer unzureichenden Reinigung des PhapII-Proteins führte, wurde eine Reinigung über eine Ionenaustauschchromatographie vorgeschaltet (Kapitel 3.5.13.2). Da der isoelektrische Punkt von PhapII 4,1 beträgt, wurde ein Anionenaustauscher verwendet, an dessen positive Gruppen PhapII über elektrostatische

Wechselwirkung binden kann. Ziel war es, Degradationsprodukte oder alternative Faltungsformen von PhapII, die eine abweichende Ladung besitzen und dementsprechend unterschiedlich stark mit dem Anionenaustauscher interagieren, zu entfernen. Es zeigte sich, dass der Hauptpeak von PhapII bei einer NaCl-Konzentration von 662 mM eluiert wurde (Abb. 39A). Ein Teil des PhapII-Proteins wurde bereits bei 403 mM NaCl von der Säule eluiert. In allen Fraktionen einschließlich der Durchlaufaktionen konnte PhapII mit Abbaubanden nachgewiesen werden (Abb. 39B). Insgesamt führte der Einsatz der Anionenaustauschchromatographie zu keiner Entfernung der Degradationsprodukte.

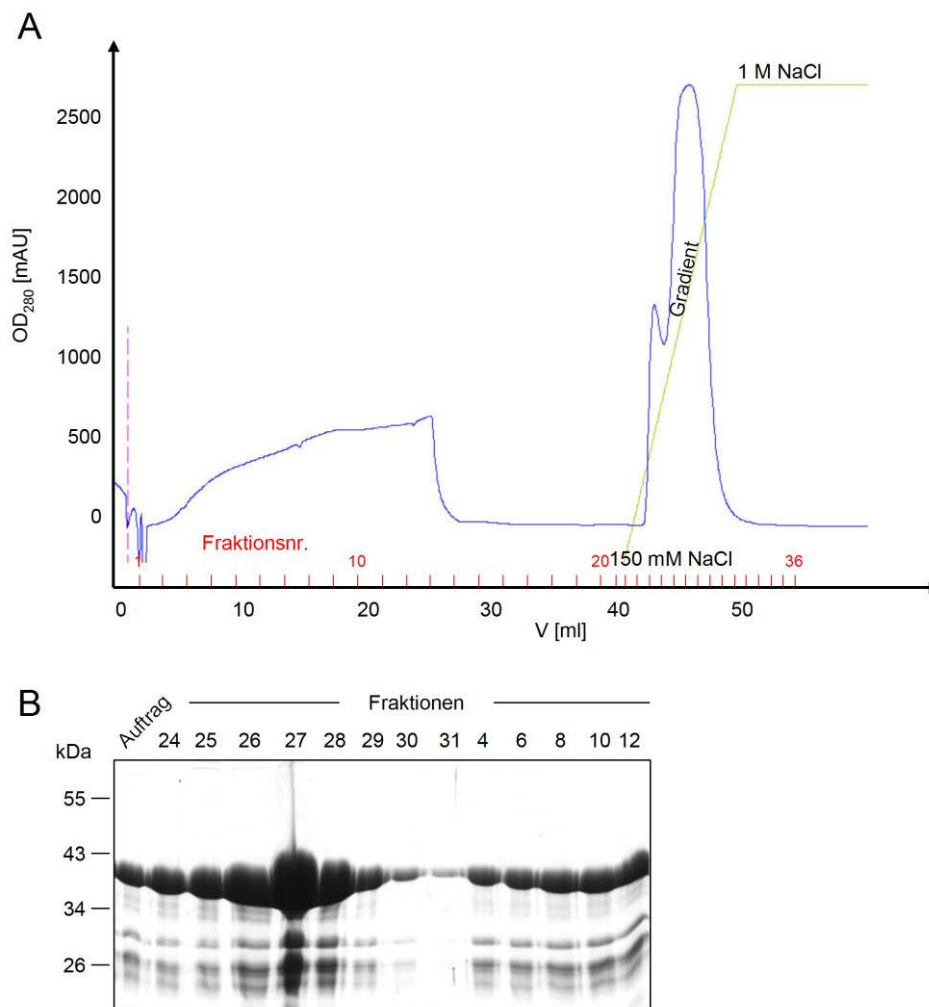


Abb. 39: Anionenaustauschchromatographie an HiTrap Q-Sepharose Fast Flow (QFF).

(A) Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie von PhapII bei 280 nm und 4 °C. Nach dem Proteinauftrag wurde die 1 ml-QFF-Säule mit 40 Säulenvolumen Puffer A (20 mM Hepes pH 7,0, 150 mM NaCl) mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min gewaschen und anschließend das Protein mit einem Gradienten von 0,15 bis 1 M NaCl mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert. Dargestellt sind die Absorptionswerte in mAU gegen das Elutionsvolumen in ml. (B) SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Fraktionen der Elutionspeaks und der Waschaktionen. Es wurden je 5 µl von 1 ml-Elutionsfraktionen und je 10 µl von ausgewählten 2 ml-Waschfraktionen aufgetragen.

Auch der Einsatz verschiedener Laufpuffer brachte keinen wesentlichen Erfolg in der Reinigung. Die anschließende Gelfiltrationschromatographie an Superdex 75 26/60 der Hauptpeakfraktionen (Fr. 24-30) führte ebenfalls zu keiner verbesserten Trennung der Degradationsprodukte (Abb. 40A und B).

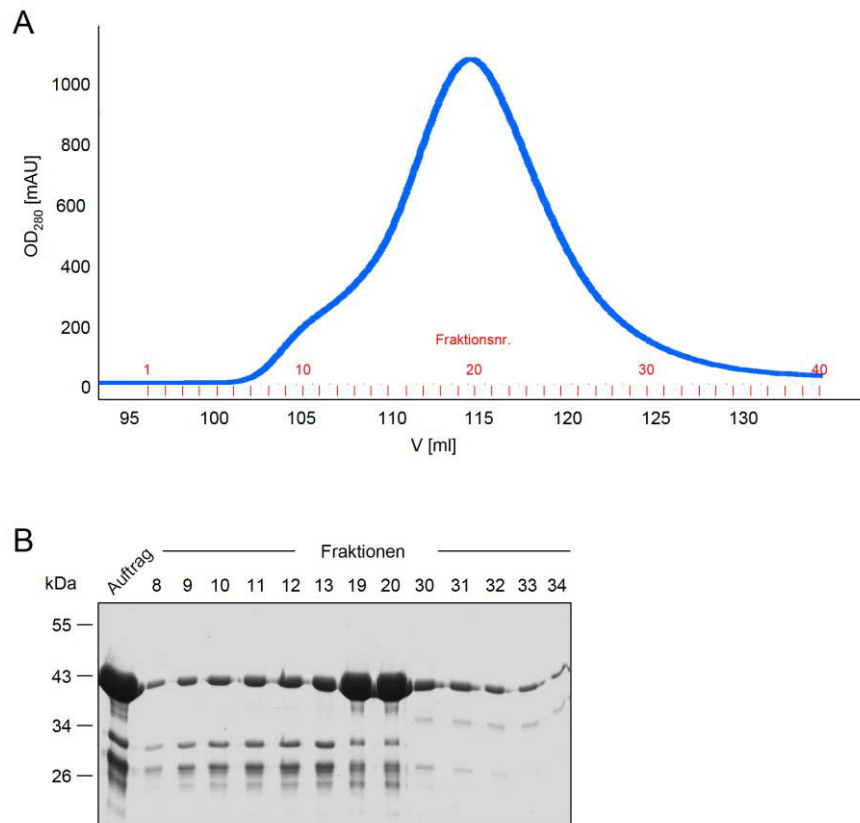


Abb. 40: Analytische Gelfiltration an Superdex 75 26/60.

(A) Elutionsprofil der Gelfiltrationsanalyse von PhapII mittels Superdex 75 26/60 detektiert bei 280 nm. Die Fraktionen 24 bis 30 der Anionenaustauschchromatographie (Abb. 39A) wurden gepoolt (Probenvolumen ca. 2,2 % vom Säulenvolumen) und auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Der Lauf wurde bei 4 °C mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. Die Säule wurde mit Laufpuffer (20 mM Hepes pH 7,0, 150 mM NaCl) eluiert, wobei die ersten durch die Säule gepumpten Fraktionen im Umfang von 0,3 Säulenvolumen verworfen wurden. Die nachfolgenden Eluate wurden bis zu einem konstant niedrigen UV-Absorptionssignal nahe dem Nullwert in 1 ml-Fractionen gesammelt. Dargestellt sind die Absorptionswerte in mAU gegen das Elutionsvolumen in ml. (B) SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Fraktionen des Signalmaximums und der Schulter des Elutionsprofils.

4.3.8.3 Reinigung von PhapII über Superdex 200 26/60

Zur Verbesserung der Trennung des PhapII-Dimers von Degradationsprodukten wurde das über Ni-NTA gereinigte His-PhapII-Protein zunächst mit Hilfe eines Konzentrators (Ausschlussvolumen: 30 kDa) von kleineren Proteinfragmenten getrennt und konzentriert. Zusätzlich wurde die Gelfiltrationssäule Superdex 200 26/60 mit einem Trennbereich von

10-600 kDa eingesetzt. Das Chromatogramm zeigte zwei Peaks mit Maxima bei 111 ml und 155 ml (Abb. 41A). Diese beiden Peaks entsprachen einer molaren Masse von 1186 bzw. 282 kDa. Der zweite Peak zeigte einen sehr weiten Größenbereich zwischen 412 und 130 kDa. Mittels SDS-PAGE konnte in allen Fraktionen PhapII sowie in geringem Maße auch Degradationsprodukte nachgewiesen werden (Abb. 41B und C).

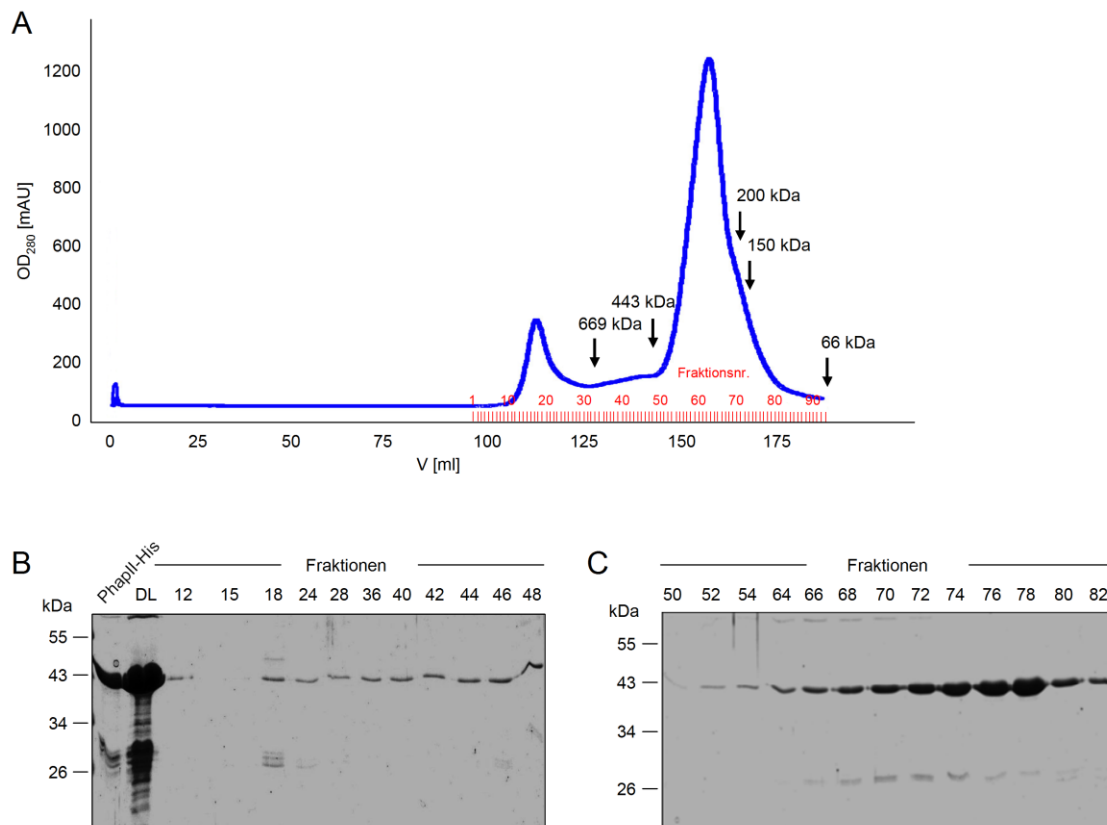


Abb. 41: Analytische Gelfiltration an Superdex 200 26/60.

(A) Elutionsprofil der Gelfiltrationsanalyse von PhapII mittels Superdex 200 26/60 detektiert bei 280 nm. Ca. 80 mg His-PhapII-Protein (Probenvolumen ca. 3,1 % vom Säulenvolumen) wurden auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und anschließend mit Laufpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) von der Säule eluiert, wobei die ersten durch die Säule gepumpten Fraktionen im Umfang von 0,3 Säulenvolumen verworfen wurden. Die nachfolgenden Eluate wurden bis zu einem konstant niedrigen UV-Adsorptionssignal nahe dem Nullwert in 1 ml-Fractionen gesammelt. Der Lauf wurde bei 4 °C mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. Dargestellt sind die Absorptionswerte in mAU gegen das Elutionsvolumen in ml. Mit Pfeilen sind die Elutionspositionen der Marker-Proteine dargestellt (669 kDa Thyroglobulin; 443 kDa Apoferritin; 200 kDa α -Amylase; 150 kDa Alkohol-Dehydrogenase; 66 kDa Albumin). (B) SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung ausgewählter Fraktionen des ersten Elutionspeaks (Fr. 12-24) und der Zwischenfraktionen 28-48. DL, Durchlauf. (C) SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung ausgewählter Fraktionen des zweiten Elutionspeaks (Fr. 50-82).

4.3.8.4 Massenspektrometrische Analyse von His-PhapII

In Kapitel 4.3.4.3 konnte massenspektrometrisch ermittelt werden, dass das C-terminal His-getaggte PhapII-Protein vom N-Terminus her abgebaut wird. Um diesem N-terminalen Abbau entgegenzuwirken bzw. N-terminal abgebaute Proteine zu entfernen, wurde ein Fusionsprotein mit N-terminalem His-*tag* generiert. Dieses Vorgehen führte zur Reinigung von Volllängenprotein, welches den Hauptanteil des gereinigten Proteins darstellte sowie zur Reinigung zahlreicher Fragmente in einem breiten Massenbereich. Um diese Fragmente zu charakterisieren und ggf. die Proteaseschnittstellen zu identifizieren, wurden das Volllängenprotein und drei prominente Fragmente ausgewählt (siehe Abb. 42A) und einer MALDI-ToF-Massenanalyse unterzogen.

In allen vier Spektren konnte das N-terminale Peptid von 2195 Da [aa 27-44] und das C-terminale Peptid von 1446 Da [aa 142-154] nachgewiesen werden (Abb. 42B und C). Bei den prominenten Fragmenten scheint es sich daher um N-terminal abgebaute Proteine des Volllänge Proteins zu handeln. Dies konnte auch mittels Western Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 35). Der C-Terminus konnte, wie schon vorher erwähnt, ab Aminosäure 210 nicht näher untersucht werden (Abb. 42D). Ebenso konnten keine Proteaseschnittstellen identifiziert werden. Andererseits zeigte das Spektrum des 17 kDa-Fragments einen zusätzlichen Peak mit einer Masse von 2103,9 Da. Dieser wurde sequenziert und ergab das Peptid K.VYAGNEHNHAAQQPQVLDI. Eine Datenbankanalyse identifizierte dieses Peptid als das 16 kDa große ribosomale *E. coli* Protein L13 (Abb. 42E). Das L13-Protein ist eines von acht ribosomalen Proteinen, das in den aktiven subribosomalen Partikeln aus 23S und 5S rRNA lokalisiert ist (Soung et al., 2009). Es besitzt mit 9,91 einen relativ hohen pI-Wert und könnte aufgrund seiner positiven Ladung mit PhapII interagieren.

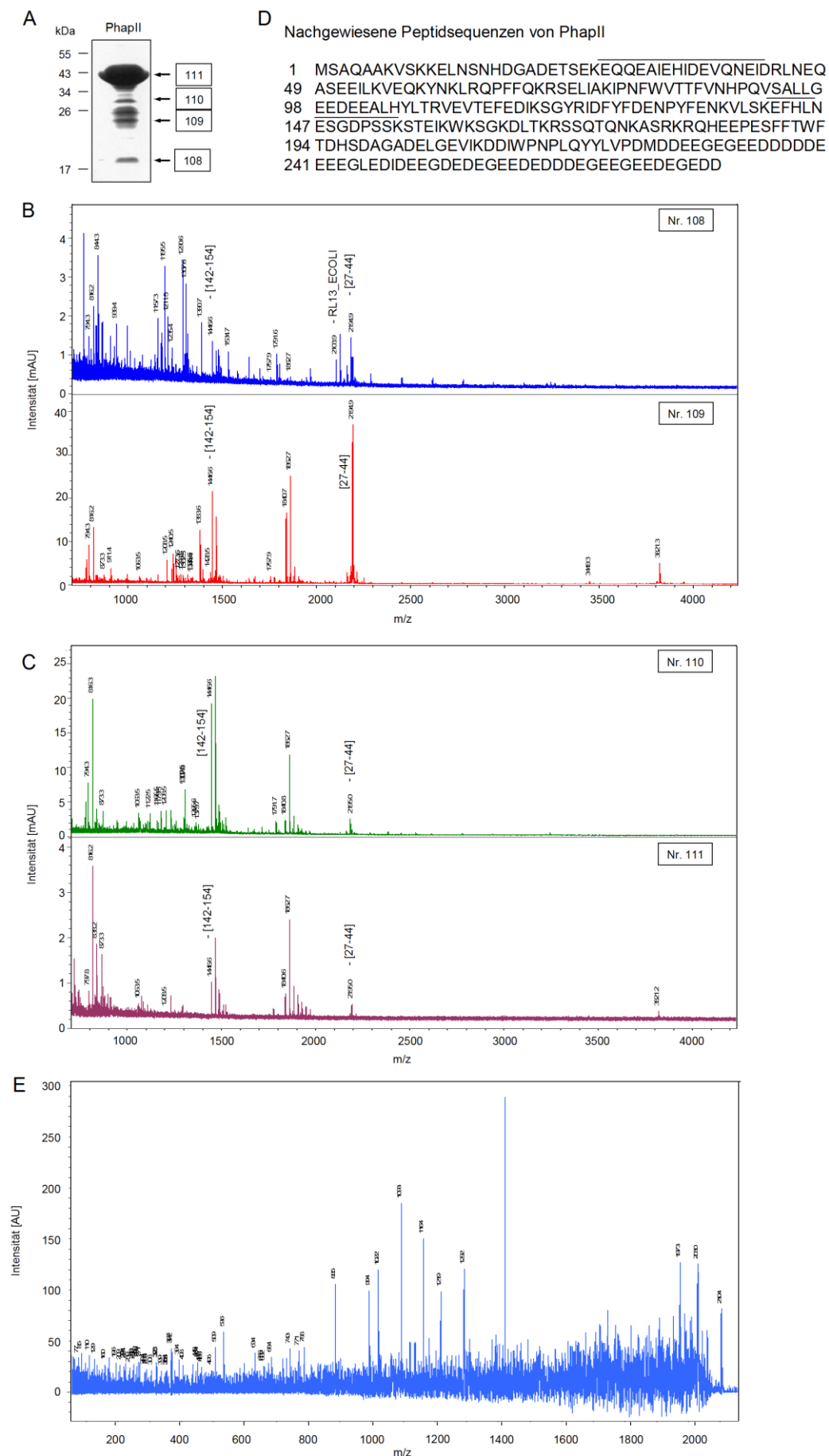


Abb. 42: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 42: MALDI-ToF-MS-Analyse von gereinigtem PhapII.

(A) SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der analysierten PhapII-Probe. Die einzelnen PhapII-Fragmente wurden mit den Nummern 108 bis 111 versehen. (B, C) Massenspektren der PhapII-Fragmente. Massenpeaks sind in Abhängigkeit von Masse-Ladungsverhältnissen (m/z) aufgetragen. In der Sequenz des humanen PhapII sind die massenspektrometrisch nachgewiesenen Peptide für die PhapII-Fragmente Nr. 108 bis 111 eingesetzt (D). (E) Massenspektrum des Peaks 2103,9 von Fragment Nr. 108. Es handelt sich um das Protein RL_13_ECOLI (P0AA10) mit einer molaren Masse von 16 kDa.

4.3.8.5 Reinigung und Charakterisierung von PhapII-Deletionsproteinen über Superdex 200 26/60

Der saure C-Terminus von PhapII ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass das Protein instabil ist. Ein weiterer Ansatz, eine proteolytische Fragmentierung von rekombinantem PhapII zu unterbinden, bestand daher in einer Verkürzung des sauren C-Terminus. Dabei sollte jedoch die Interaktion mit LScyto erhalten bleiben. In Kapitel 4.1.3 wurden mehrere Deletionsproteine generiert, die einen um 20-50 Aminosäuren verkürzten C-Terminus besitzen. Für alle PhapII-Varianten konnte eine Bindung zu LScyto, obwohl diese im Vergleich zum Volllängeprotein vermindert war, nachgewiesen werden (Abb. 10). Die Affinitäten von PhapII 1-257 und PhapII 1-247 zu LScyto waren jedoch noch ausreichend hoch, so dass diese Deletionsproteine für die Co-Kristallisation infrage kämen (Tab. 12). Nichtsdestotrotz zeigten beide Deletionsproteine dem Volllängenprotein vergleichbare Degradationsprodukte (vgl. Abb. 9A und B, Abb. 36), die über eine Gelfiltration nicht entfernt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Trennung über Superdex 200 26/60 führte auch hier zu Elutionspeaks, die deutlich höheren molaren Massen als 42 kDa entsprachen. Im Vergleich zum Volllängenprotein war die Verschiebung zur höheren Masse allerdings deutlich weniger ausgeprägt (Abb. 43A und B). Die apparente molare Masse von PhapII 1-257 betrug auf der Gelfiltrationssäule 213 kDa (= 163 ml), obwohl das Protein als Dimer aus 2 x 257 Aminosäureresten besteht und damit eine molare Masse von 59,8 kDa aufzeigen sollte. Die aus 2 x 247 Aminosäureresten bestehendes Deletionsprotein PhapII 1-247 eluierte hingegen nach 167 ml, was einer molaren Masse von 186,4 kDa entsprechen würde. Die errechnete molare Masse war hingegen 57,6 kDa.

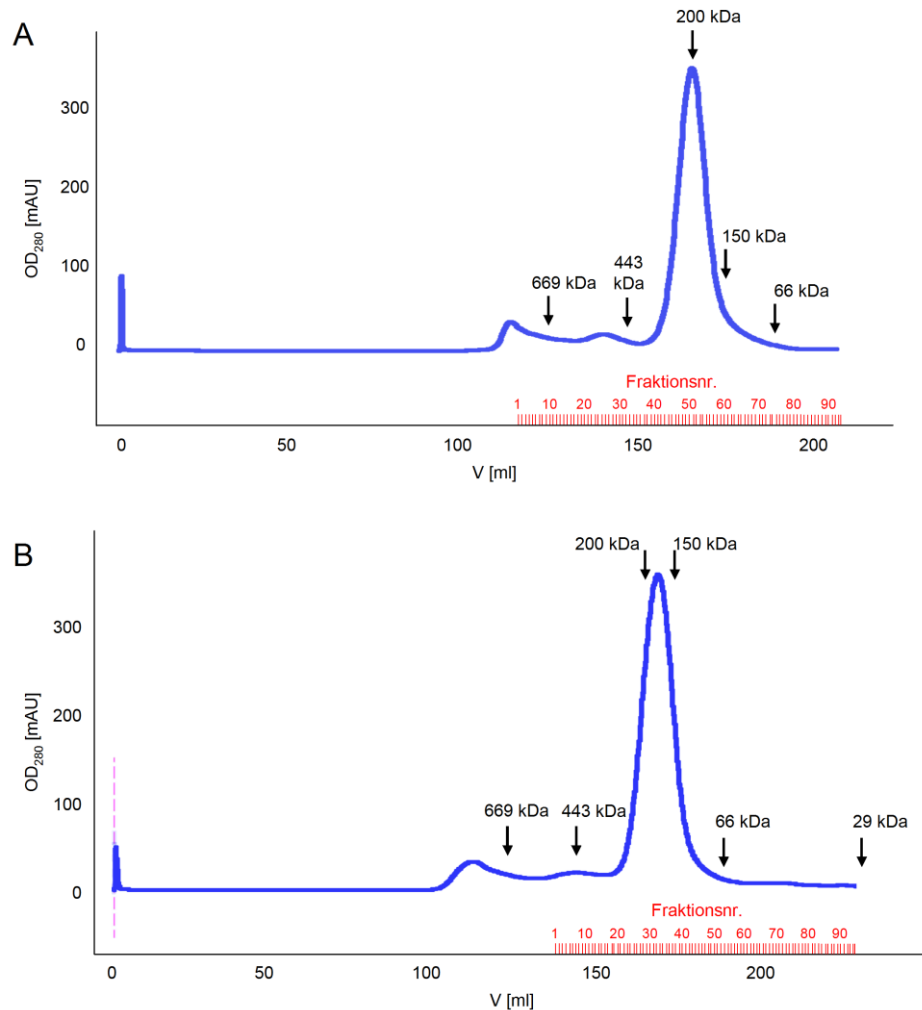


Abb. 43: Analytische Gelfiltration von His-PhapII 1-257 und His-PhapII 1-247.

Elutionsprofile der Gelfiltrationsanalysen von (A) His-PhapII 1-257 und (B) His-PhapII 1-247 mittels Superdex 200 26/60 detektiert bei 280 nm. Beide Proteine wurden über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert und die dialysierten Proteine auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Proteine wurden auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen (ca. 9 bzw. 12 mg Protein; Probenvolumen ca. 0,94 bzw. 3,1 % vom Säulenvolumen) und anschließend von der Säule eluiert, wobei die ersten durch die Säule gepumpten Fraktionen im Umfang von 0,33 bzw. 0,4 Säulenvolumen verworfen wurden. Die nachfolgenden Eluate wurden bis zu einem konstant niedrigen UV-Adsorptionssignal nahe dem Nullwert in 1 ml-Fractionen gesammelt. Der Lauf wurde bei 4 °C mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. Dargestellt sind die Absorptionswerte in mAU gegen das Elutionsvolumen in ml. Mit Pfeilen sind die Elutionspositionen der Marker-Proteine dargestellt (669 kDa Thyroglobulin; 443 kDa Apoferritin; 200 kDa α -Amylase; 150 kDa Alkohol-Dehydrogenase; 66 kDa Albumin; 29 kDa Carboanhydrase).

4.3.9 Konstruktion von *phapII* in *pGEX4T-2*

Obwohl ein N-terminaler His-tag der Bildung einer trunkierten Proteinform von PhapII entgegenwirkte, unterlag das His₆-PhapII-Protein gleichwohl einer ausgeprägten Proteolyse. Die proteolytische Abspaltung findet vor allem im Verlauf der Expression statt. Der ursprüngliche Grund für die Wahl des pET-Systems war, dass es die

Möglichkeit bot, das PhapII-Protein ohne einen großen *tag* zu exprimieren. Ein großer *tag*, wie z. B. die Glutathion S-Transferase (GST), nimmt mehr als ein Drittel des exprimierten GST-Fusionsproteins (GST: 26 kDa; vgl. His-*tag*: 1 kDa) ein, der verworfen werden muss, da für die Kristallisation die *tags* nach der Reinigung abgespalten werden müssen. Große Fusionsanteile können allerdings die Löslichkeit des exprimierten Proteins erhöhen, deren Faltung verbessern und vor proteolytischer Spaltung schützen (Bowie und Sauer, 1989; Koken et al., 1993), so dass als nächstes PhapII mit einem N-terminalen GST-*tag* fusioniert wurde. Dazu wurde *phapII* mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EheI* und *XhoI* aus dem Vektor pIBA-ASK5-PhapII herausgeschnitten und in den mit *SmaI/XhoI* verdauten pGEX4T-2-Vektor *blunt* kloniert, in dem die Expression unter der Kontrolle vom *tac*-Promotor steht (Abb. 44).

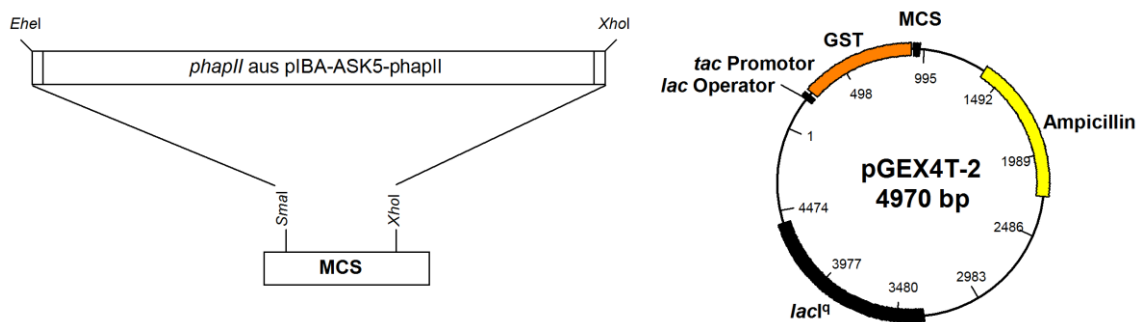


Abb. 44: Konstruktion des Expressionsvektors pGEX4T-2 zur Herstellung von N-terminalem GST-PhapII-Fusionsprotein.

Das *phapII*-Gen wurde über einen *EheI/XhoI*-Restriktionsverdau aus dem Konstrukt pIBA-ASK-5-*phapII* herausgeschnitten und in den mit *SmaI/XhoI* verdauten pGEX4T-2-Vektor kloniert. Ampicillin, Ampicillinresistenzgen; *lacI^q*: Repressor des *lac*-Operons; GST, Glutathion S Transferase *tag*.

Der Vektor ist mit dem *lacI^q*-Gen ausgestattet, dessen Genprodukt, ein Repressorprotein, an die Operatorregion des *tac*-Promotors bindet und die Expression bis zur IPTG-Induktion unterdrückt (Smith und Johnson, 1988). Die präparierten Plasmide von positiven Klonen wurden für die Überexpression in den *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) *plysS* transformiert.

4.3.10 Expression und Reinigung von GST-PhapII

Die Expression von GST-PhapII wurde wie in Kapitel 3.5.2.1 beschrieben durchgeführt und das Protein mittels Glutathion-Affinitätschromatographie gereinigt (Kapitel 3.5.2.4). Eine Verminderung der Abbauprodukte war auch hier nicht zu erkennen (Abb. 45).

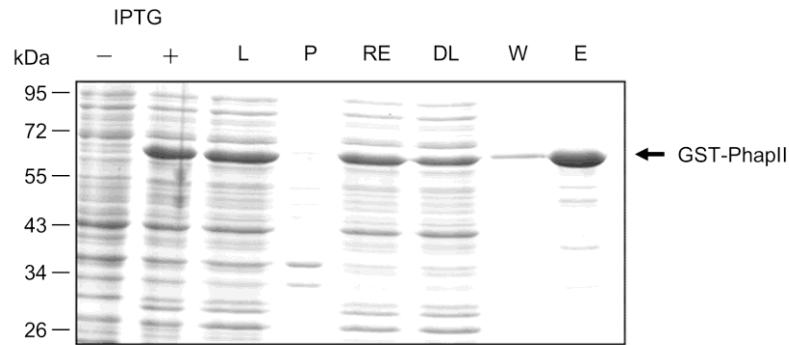


Abb. 45: Glutathion-Affinitätschromatographie von Lysat aus GST-PhapII exprimierenden Rosetta (DE3) pLysS.

Die induzierten Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und anschließend einer Glutathion-Affinitätschromatographie unterzogen. Verschiedene Reinigungsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. -IPTG, Gesamtzelllysate vor Induktion; +IPTG, Gesamtzelllysate nach Induktion; L, Lysat nach Induktion und Zellaufschluss; P, Pellet nach Induktion und Zellaufschluss; RE, Rohextrakt; DL, Durchlauf; W, Waschen; E, Eluat.

Nach einem Thrombinverdau zur Spaltung des GST-tags wurde dieser mit Hilfe von GSH-Sepharose entfernt und das PhapII-Protein anschließend einer zusätzlichen Reinigung über Superdex 75 16/60 unterzogen. Dies führte zur restlosen Entfernung des abgespaltenen GST-tag aus der Proteinlösung, wobei Abbaubanden erhalten blieben (Abb. 46A und B).

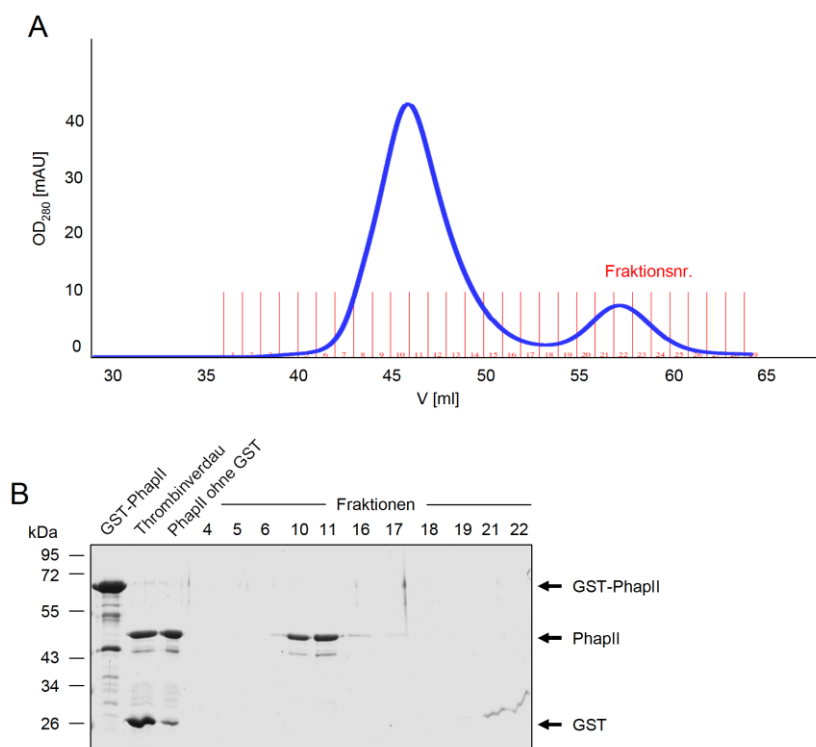


Abb. 46: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 46: Analytische Gelfiltration an Superdex 75 16/60.

(A) Elutionsprofil der Gelfiltrationsanalyse von PhapII mittels Superdex 75 16/60 detektiert bei 280 nm. Das GST-PhapII-Protein wurde über Glutathion-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe Abb. 45) und der GST-tag mit Thrombin gespalten und mittels GSH-Beads entfernt. Anschließend wurde PhapII (Probenvolumen ca. 3,3 % vom Säulenvolumen) auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und anschließend eluiert, wobei die ersten durch die Säule gepumpten Fraktionen im Umfang von 0,3 Säulenvolumen verworfen wurden. Die nachfolgenden Eluate wurden bis zu einem konstant niedrigen UV-Absorptionssignal nahe dem Nullwert in 1 ml-Fractionen gesammelt. Der Lauf wurde bei 4 °C mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. Dargestellt sind die Absorptionswerte in mAU gegen das Elutionsvolumen in ml. (B) SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Proben vom GST-PhapII-Thrombinverdau und der Fraktionen der zwei Signalmaxima von der Gelfiltrationssäule.

4.3.11 Co-Expression von PhapII und LScyto: Konstruktion und Reinigung

Aus vielen Untersuchungen ist bekannt, dass Proteine in Gegenwart ihrer Interaktionspartner eine stabilere Form einnehmen können. Da bei alleiniger Expression von PhapII Degradationsprodukte auftraten, bestand die Möglichkeit, dass PhapII bei Expression mit einem Interaktionspartner stabilisiert wird. Daher wurde eine kombinierte Expression der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin mit Volllängen-PhapII durchgeführt.

Dazu wurden die Sequenzen für His-PhapII aus dem Konstrukt pET-28a-phapII und für GST-LScyto aus pJET-1-GST-LScyto mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *XhoI* bzw. *NdeI* und *XhoI* herausgeschnitten und in den pETDuetTM-1 Vektor kloniert (Abb. 47A). Dieser Vektor ist geeignet für die Expression von zwei Zielgenen, da er unter anderem zwei multiple Klonierungsstellen (MCS) mit jeweils einem T7-Promotor/*lac*-Operator und einer ribosomalen Bindestelle besitzt. Das pETDuet-1-GST-LScyto-His-PhapII-Konstrukt wurde in den *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS transformiert und, wie in Kapitel 3.5.2.1 beschrieben, exprimiert. Mit diesem Ansatz konnten beide Proteine gleichzeitig exprimiert werden (Abb. 47B).

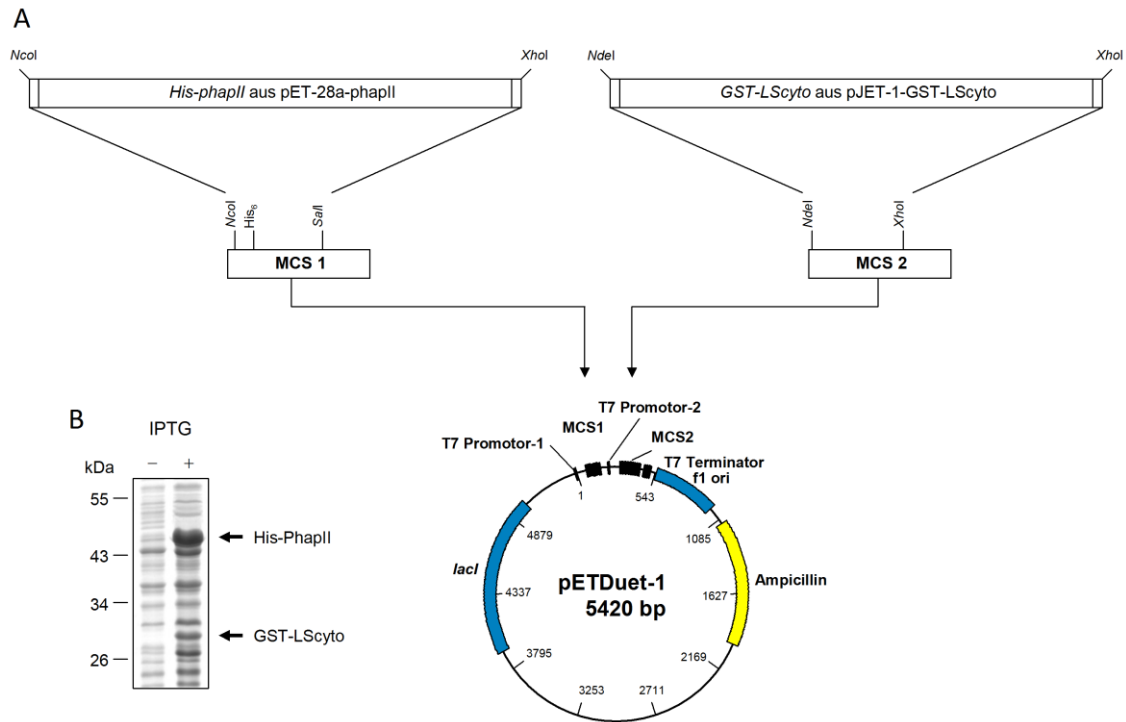


Abb. 47: Strategie zur Klonierung von *His-phapII* und *GST-LScyto* in den pETDuet-1-Vektor und Co-Expression von His-PhapII und GST-LScyto im *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS.

(A) Zunächst wurde *GST-LScyto* über einen *NdeI/XhoI*-Restriktionsverdau aus dem Zwischenkonstrukt pJET-1-GST-LScyto herausgeschnitten und in den ebenfalls *NdeI/XhoI* verdauten pETDuet-1-Vektor kloniert. Plasmide aus positiven Klonen wurden präpariert und mit den Restriktionsendonukleasen *SalI* und *XhoI* verdaut. Gleichzeitig wurde *His-phapII* aus dem Konstrukt pET28a-phapII über einen *NcoI/XhoI*-Restriktionsverdau herausgeschnitten und in pETDuet-1-GST-LScyto kloniert. MCS 1,2, Multiple Cloning Sites; f1 ori, Replikationsursprung des Bakteriophagen f1; Ampicillin, Ampicillinresistenzgen; *lacI*, Repressor des *lac*-Operons. (B) Die Bakterienzellen wurden bei 37 °C nach Erreichen ihrer logarithmischen Wachstumsphase mit 1 mM IPTG induziert. Nach 2 h wurden die *E. coli*-Kulturen geerntet und lysiert. Aliquots von Gesamtzelllysat vor und nach IPTG-Induktion wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert.

Die Expression beider Proteine wurde im weiteren Verlauf mittels Western Blot-Analyse untersucht (siehe unten). Der Rohextrakt wurde zunächst auf eine Ni-NTA-Affinitätssäule gegeben, um His-PhapII und His-PhapII im Komplex mit GST-LScyto zu reinigen. Anschließend wurde das Eluat auf eine GSH-Sepharosesäule gegeben. Hierbei sollten nur GST-LScyto/His-PhapII-Komplexe isoliert werden. Die Reinigungsfractionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und es zeigte sich, dass schon im ersten Reinigungsschritt über die Ni-NTA-Sepharose His-PhapII trotz guter Expressionsrate nicht an die Säule gebunden wurde (Abb. 48).

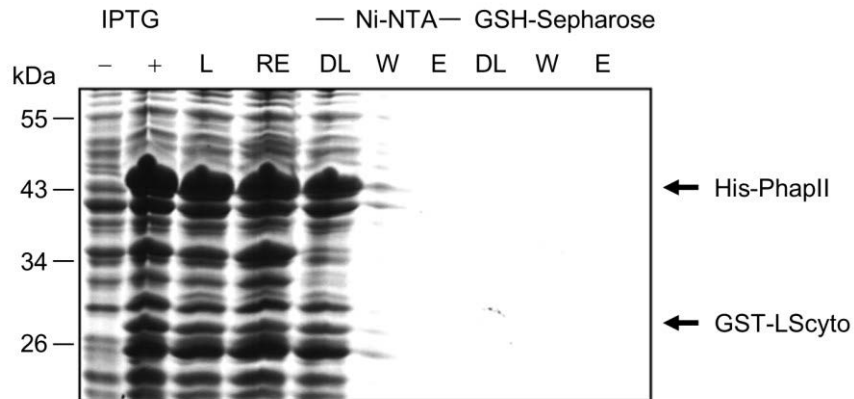


Abb. 48: Isolierung von His-PhapII und GST-LScyto im Komplex über eine hintereinander geschaltete Reinigung mittels Ni-NTA- und Glutathion-Affinitätschromatographie.

Der Rohextrakt von induzierten *E.coli*-Zellen wurde auf eine Ni-NTA-Affinitätssäule gegeben, um His-PhapII und His-PhapII im Komplex mit GST-LScyto zu reinigen. Anschließend wurde das Eluat einer Glutathion-Affinitätschromatographie unterzogen, um den His-PhapII/GST-LScyto-Komplex zu isolieren. Verschiedene Fraktionen der Reinigung wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. -IPTG, Gesamtzelllysat vor Induktion; +IPTG, Gesamtzelllysat nach Induktion; L, Lysat nach Induktion und Zellaufschluss; RE, Rohextrakt; DL, Durchlauf; W, Waschen; E, Eluat.

Eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen führte dagegen zur Bindung von His-PhapII an die Säule und auch zur Elution (Abb. 49). Wahrscheinlich wird der His-tag durch die Bindung von PhapII an GST-LScyto daran gehindert an die Ni-NTA zu binden oder die Bindung von His-PhapII an GST-LScyto führt zu einer Konformationsänderung von His-PhapII und unterbindet so die Interaktion mit der Ni-NTA-Sepharose. Durch die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen werden Bindungen zu Interaktionspartnern aufgelöst, da die Proteine nur noch als Polypeptidkette vorliegen. Daher wurde die primäre Reinigung über die GSH-Sepharosesäule durchgeführt und bewirkte eine problemlose Reinigung von GST-LScyto und dem GST-LScyto-His-PhapII-Komplex (Abb. 50). Die Menge von His-PhapII war jedoch gering. Eine stärkere Interaktion zwischen PhapII und LScyto konnte auch durch Erniedrigung der NaCl-Konzentration von 300 mM auf 50, 25 bzw. 0 mM nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Auch die geringe Expressionsrate von GST-LScyto ließ sich durch Erniedrigung der Induktionstemperatur von 37 °C auf 30, 25 und 20 °C bzw. durch einen Wechsel des Expressionsstammes auf BL21 (DE3) nicht verbessern (Daten nicht gezeigt).

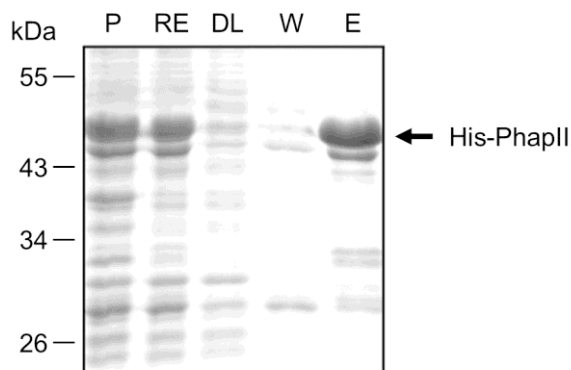


Abb. 49: Ergebnis der denaturierenden Reinigung von His-PhapII aus pETDuet-1-GST-LScyto-PhapII transformierten und induzierten Rosetta (DE3) pLysS.

Das eingefrorene Zellpellet von induzierten *E. coli* wurde in 8 M Urea resuspendiert und 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand auf eine Ni-NTA-Säule geladen. Die Reinigung wurde durchgeführt wie in Kapitel 3.5.2.3 beschrieben. Verschiedene Fraktionen der Reinigung wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. P, Pellet in Harnstoff-Lysepuffer nach Induktion und Zellaufschluss; RE, Rohextrakt; DL, Durchlauf; W, Waschen; E, Eluat.

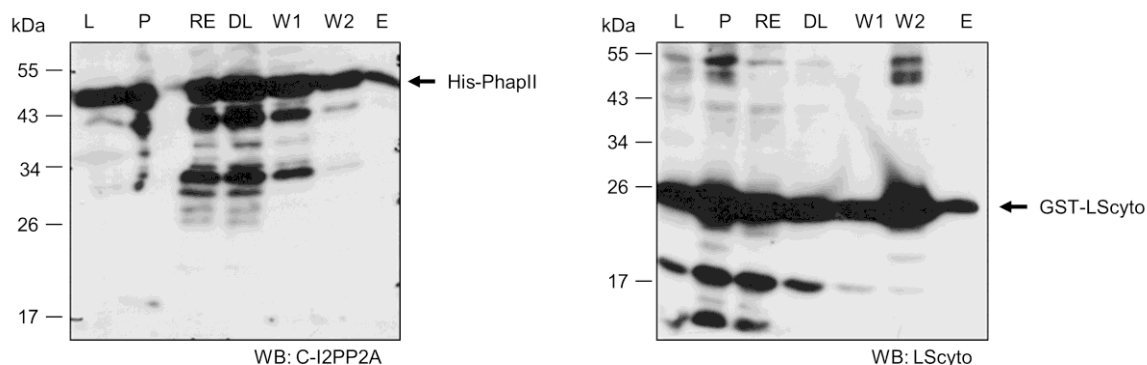


Abb. 50: Western Blot-Analyse der Co-Reinigung von His-PhapII und GST-LScyto über eine Glutathion-Affinitätschromatographie.

Das Lysat von induzierten *E. coli*-Zellen wurde auf eine Glutathion-Affinitätssäule gegeben, um GST-LScyto und GST-LScyto im Komplex mit His-PhapII zu reinigen. Verschiedene Fraktionen der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf eine Membran transferiert. L, Lysat nach Induktion und Zellaufschluss; P, Pellet nach Induktion und Zellaufschluss; RE, Rohextrakt; DL, Durchlauf; W, Waschen; E, Eluat. Der Nachweis der Proteine erfolgte unter Verwendung eines anti-I2PP2A-Antikörpers, der gegen ein Epitop im C-Terminus von PhapII gerichtet war, (A) bzw. unter Verwendung eines anti-LScyto-Antikörpers (B).

4.3.12 LScyto-Affinitätsreinigung von PhapII

Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung von Kristallisationsversuchen ist die Gewinnung von nicht degradiertem PhapII. Die bisher verwendeten Expressionssysteme bzw. Reinigungsversuche erwiesen sich als ungeeignet für die Herstellung von PhapII. Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung von PhapII stellt die Reinigung über eine

LScyto-Säule dar. Da nur funktionsfähiges PhapII an LScyto bindet, sollten degradierte Varianten, die die Bindungsfähigkeit verloren haben, nicht isoliert werden. In den vorhergehenden Co-Präparationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass PhapII über GST-LScyto gereinigt werden kann, wenn dieses an eine GSH-Sepharosesäule gekoppelt vorlag. Das GST-LScyto-Fusionsprotein konnte in dem pGEX4T-1-Vektor mit guter Ausbeute exprimiert werden (Daten nicht gezeigt) und wurde für die Affinitätsreinigung von PhapII in ausreichender Menge an die GSH-Sepharose gekoppelt (Kapitel 3.5.13.4). Wie in Abb. 51 zu sehen ist, bindet PhapII effizient an die LScyto-Affinitätssäule und lässt sich hauptsächlich bei einer NaCl-Konzentration von 0,45-0,55 M eluieren. Die meisten Degradationsprodukte unterhalb von 30 kDa hatten entweder nicht an die Säule gebunden oder wurden erst bei einer höheren NaCl-Konzentration eluiert. Nichtsdestotrotz blieb das PhapII-Protein nicht frei von Degradationsprodukten. Es ist jedoch bindungsaktiv und lässt sich für weitere biochemische Untersuchungen verwenden.

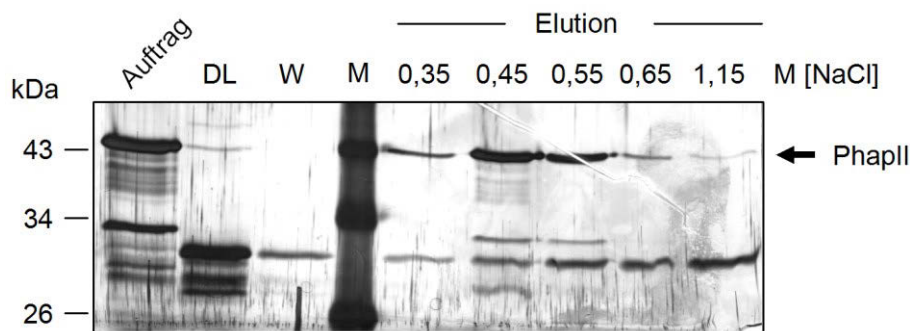


Abb. 51: Reinigung von PhapII über eine LScyto-Affinitätssäule.

Zunächst wurden 3 mg GST-LScyto-Fusionsprotein an 600 µl GSH-Sepharose im Batch-Verfahren über Nacht bei 4 °C gekoppelt. Danach wurde die mit GST-LScyto beladene GSH-Sepharose durch Waschen mit 1x TBS von ungebundenem Protein befreit und anschließend in eine Econo-Pac-Säule gepackt. Ein Aliquot vom PhapII-Protein aus der ersten Peakfraktion der Gelfiltrationschromatographie an Sephacryl S 200 26/100 (siehe Abb. 28) wurde auf die Säule gegeben, mit 10 Säulenvolumen 1x TBS gewaschen und mit einem NaCl-Stufengradienten eluiert. Die verschiedenen Reinigungsfractionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend silbergefärbt. DL, Durchlauf; W, Waschen; M, Marker.

4.3.13 *Expression von PhapII in HEK-293: Konstruktion und Reinigung*

Die verschiedenen Expressionsversuche in *E. coli* zeigten, dass die Expression rekombinanter PhapII-Proteine zu Degradationsprodukten führt. Eine Alternative zur bakteriellen Genexpression stellt die Expression heterologer Gene in eukaryotischen Systemen dar. Im Gegensatz zu prokaryotischen Proteinen werden eukaryotische Proteine posttranslational modifiziert, wie z. B. glykosyliert, acyliert oder phosphoryliert. Diese

Modifizierungen können auch zur Stabilisierung des Proteins beitragen. Eine Datenbanksuche im NetNGlc 1.0 Server der Technischen Universität von Dänemark nach vermeintlichen N-Glykosylierungsstellen im humanen PhapII-Protein zeigte eine potenzielle Stelle bei Aminosäure 146-149 (NESG). Die PhapII-Sequenz besitzt allerdings keine Signalsequenz, was es unwahrscheinlich macht, dass das rekombinante Protein in nicht-glykosylierter Form in das ER transferiert und hier potenziell glykosyliert wird.

Für die Expression in HEK-293-Zellen wurde das *His-phapII*-Gen zunächst über eine PCR mit den Primern PhapII HindIII Kozak fwd und PhapII XhoI rev. aus dem pQE-30-phapII-Konstrukt amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XhoI* verdaut und in die ebenfalls *HindIII* und *XhoI* geschnittenen Vektoren pCR3.1 und pcDNA6/V5-HisA kloniert (Abb. 52).

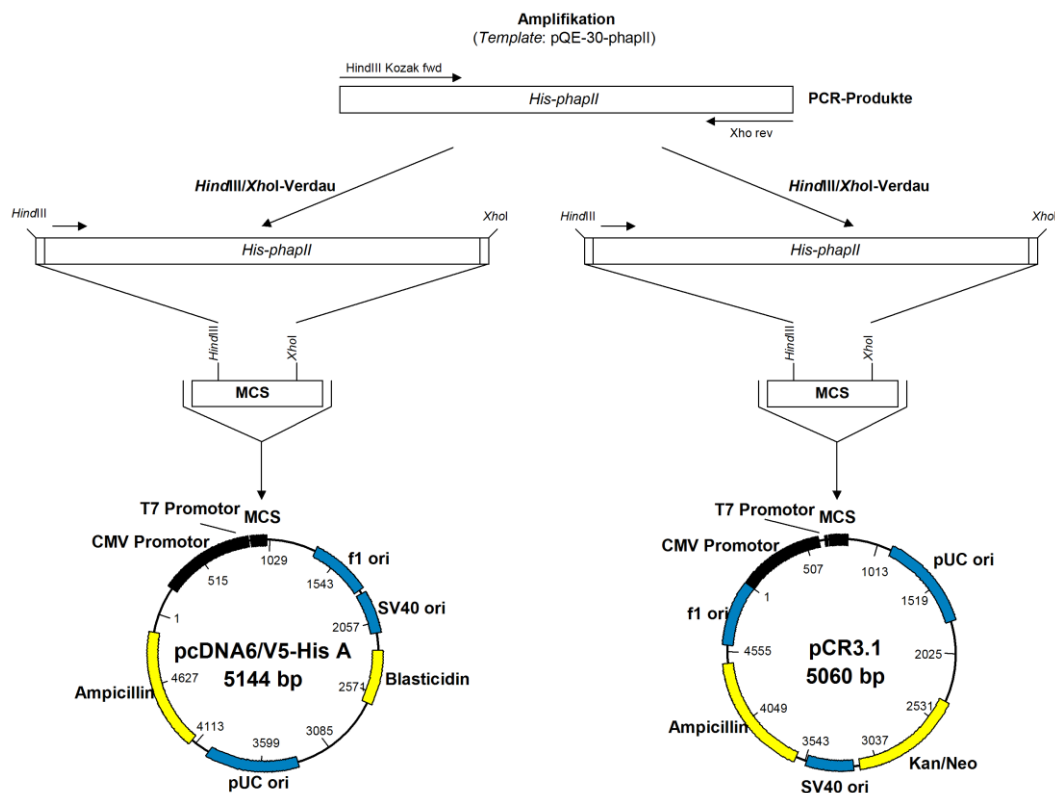


Abb. 52: Konstruktion der Vektoren pCR3.1 und pcDNA6/V5-His A zur eukaryotischen Expression von N-terminal His₆-getagtem PhapII-Protein.

Das *His-phapII*-Gen wurde zunächst über eine PCR mit den Primern PhapII HindIII Kozak fwd und PhapII XhoI rev. amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XhoI* verdaut und in die ebenfalls mit *HindIII/XhoI* geschnittenen Vektoren pCR3.1 und pcDNA6/V5-His A kloniert. MCS, Multiple Cloning Site; f1 ori, Replikationsursprung des Bakteriophagen f1; Ampicillin, Ampicillinresistenzgen; Kan/Neo, Kanamycin/Neomycinresistenz; Blastidicin, Blastidicinresistenz; pUC ori, ColE1-Replikationsursprung; SV40 ori, SV40-Replikationsursprung.

Positive Plasmide wurden in HEK-293-Zellen transfiziert (Kapitel 3.4.4). Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen geerntet, in 0,5 % Triton X-100 lysiert, zentrifugiert und

der Zelltrümmer freie Überstand mit den löslichen Proteinen auf eine Ni-NTA-Affinitätssäule aufgetragen. In Abb. 53 ist dargestellt, dass die His-PhapII-Proteine beider Expressionssysteme an die Säule gebunden haben und mit 250 mM Imidazol eluiert werden konnten. Die Reinheit des Proteins war gut. Allerdings war die Ausbeute gering. Aus einer 60 mm Kulturschale konnten lediglich 2,61 µg (pCR3.1-His-phapII) bzw. 1,98 µg (pcDNA6-His-phapII) Protein gewonnen werden. Für Kristallisationsversuche ist dies jedoch zu wenig.

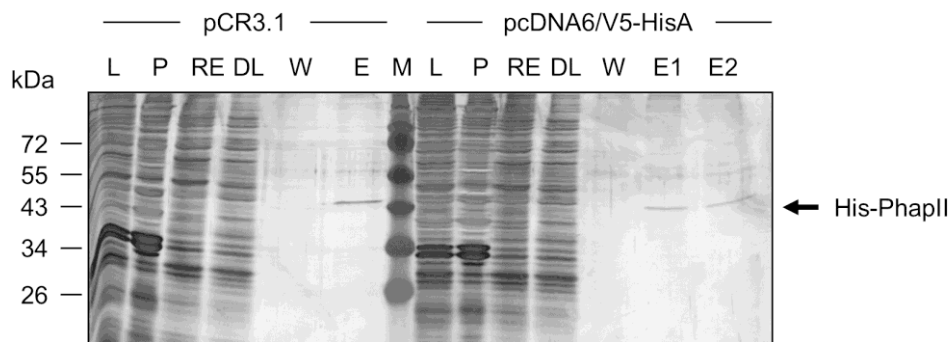


Abb. 53: Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit Lysat aus His-PhapII exprimierenden HEK-293-Zellen.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und anschließend einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie unterzogen. Verschiedene Reinigungsfraktionen wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. L, Lysat nach Zellaufschluss; P, Pellet nach Zellaufschluss; RE, Rohextrakt; DL, Durchlauf; W, Waschen mit 30 mM Imidazol; E, Eluat; M, Marker.

4.3.14 Kristallisationsversuche

Für Kristallisationsscreens wurde das in pET45b-phapII_Thrombin exprimierte PhapII-Protein eingesetzt, das zuvor vom His-tag befreit und über die Gelfiltrationschromatographie an Superdex 200 26/60 einer weiteren Reinigung unterzogen worden war. Beginnend mit einer Konzentration von 10 mg/ml, die zu keiner Kristallbildung führte, wurde die Konzentration erhöht und ergab unter folgenden Bedingungen Kristalle: 50 % MPD; 0,1 M Tris, pH 8,5; 0,2 M Ammoniumdihydrogenphosphat; Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen bei 18 °C, 26 mg/ml Protein in 20 mM Hepes, pH 7,0, 150 mM NaCl.

Eine Messung mittels des Röntgendiffraktometers ergab, dass es sich bei dem Kristall um einen Salzkristall handelte und nicht um einen Proteinkristall, so dass in den nachfolgenden Screens Proteinlösungen ohne NaCl verwendet wurden. Darüber hinaus zeigte sich, dass das PhapII-Protein in Puffer gut löslich war, was auch auf den Einfluss

von NaCl zurückzuführen sein könnte. Um die Präzipitation des PhapII-Proteins zu erhöhen, wurde es bis zu einer Konzentration von 70 mg/ml angereichert und zusammen mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin in den Kristallisationsscreens eingesetzt. Jedoch war auch unter diesen Bedingungen keine erfolgreiche Kristallisation von PhapII möglich.

4.4 Einfluss von L-Selektin-Antikörper-Aktivierung auf die Cytokinausschüttung von Leukozyten

Cytokine spielen bei der Regulation der Zelladhäsion während der Entzündungsantwort eine wesentliche Rolle. Die Rekrutierung von Leukozyten (Neutrophile, Monozyten), Makrophagen und dendritischen Zellen an Orte der Inflammation und die Induktion bestimmter Zelladhäsionsmolekülen werden über Cytokine vermittelt. Darüber hinaus können rekrutierte Zellen selbst Cytokine ausschütten und so andere Zellarten beeinflussen. Ferner kann auch über die Aktivierung von Zelladhäsionsmolekülen die Cytokinausschüttung gesteuert werden. So wird zum Beispiel nach Stimulation von L-Selektin neben der Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen und Superoxiden (O_2^-) auch die Expression von TNF- α - und IL-8-mRNA in Neutrophilen induziert (Laudanna et al., 1994; Waddell et al., 1995). Die Tatsache, dass Neutrophile nach L-Selektin-Crosslinking mit Antikörpern ebenfalls O_2^- bilden und Ca^{2+} freisetzen können (Crockett-Torabi et al., 1995), weist dies darauf hin, dass in Leukozyten, die an der Migration in entzündetes Gewebe, oder in Lymphozyten während des Homings die Stimulation des Adhäsionsrezeptors L-Selektin an der Regulation der Cytokinausschüttung beteiligt ist. Dieser Möglichkeit wurde in ersten orientierenden Versuchen nachgegangen, wobei sich die Experimente auf Einzelbeobachtungen beschränkten.

4.4.1 Nachweis der Expression von L-Selektin und zellspezifischen Oberflächenmarkern auf Granulozyten und T-Lymphozyten

Für diese Versuche wurden jeweils Granulozyten und T-Lymphozyten aus frischem Vollblut isoliert (siehe 3.4.5.3 und 3.4.5.2) und vor ihrem Einsatz in Cytokinarrays auf ihre Expression nach L-Selektin und zellspezifischen Oberflächenmarkern untersucht. Dazu wurden die Granulozyten mit FITC markierten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3, CD19, CD66b und CD62L angefärbt. CD66b ist ein Pan-Granulozytenmarker, CD62L ist L-Selektin, das im Falle einer Aktivierung der Zelle an

der Oberfläche proteolytisch gespalten wird. CD3 und CD19 dienten als Kontrollen und zeigen auf mögliche Kontamination mit T-Zellen oder B-Zellen. In Abb. 54 ist zu sehen, dass es sich bei 97,3 % der isolierten Zellen um Granulozyten handelte. Es waren nur minimale Verunreinigungen mit T- und B-Zellen zu verzeichnen. Allerdings waren nur 94,3 % der Granulozyten positiv für L-Selektin. Das deutete darauf hin, dass ein kleiner Teil der Zellen während der Zellisolation oder der hypotonen Lyse stimuliert wurde, gefolgt von einem Verlust von L-Selektin.

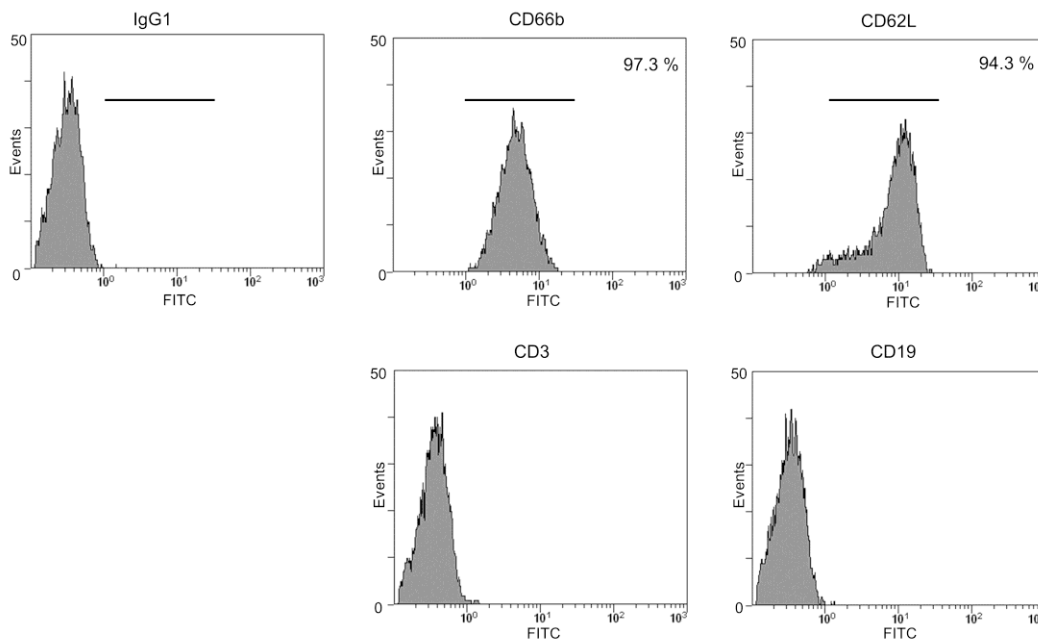


Abb. 54: Bestimmung der Expression von CD66b und CD62L in isolierten Granulozyten.

Die Granulozyten wurden mit FITC-markierten Antikörpern gegen CD66b oder CD62L gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. FITC-markierte Antikörper gegen CD3 und CD19 dienten als Kontrollen auf mögliche Kontamination mit T-Zellen oder B-Zellen. IgG1 diente als Isotypkontrolle.

Als Positivmarker für T-Lymphozyten diente ein FITC markierter Antikörper gegen den T-Zell-Rezeptor (TCR/CD3). In Abb. 55 ist zu sehen, dass 98,1 % der isolierten Zellen T-Lymphozyten sind und zu 82 % L-Selektin exprimieren. Wahrscheinlich ist die niedrigere L-Selektin-Oberflächenexpression auf die Aktivierung der Zellen während der Präparation zurückzuführen. Der Einsatz von FITC markierten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD19 und CD66b dienten als Kontrollen auf Kontamination mit B-Zellen und Granulozyten sowie IgG1 als Isotypkontrolle. In den Kontrollansätzen ist zu beobachten, dass 3,59 % der isolierten Zellen B-Lymphozyten und 2,82 % Granulozyten sind.

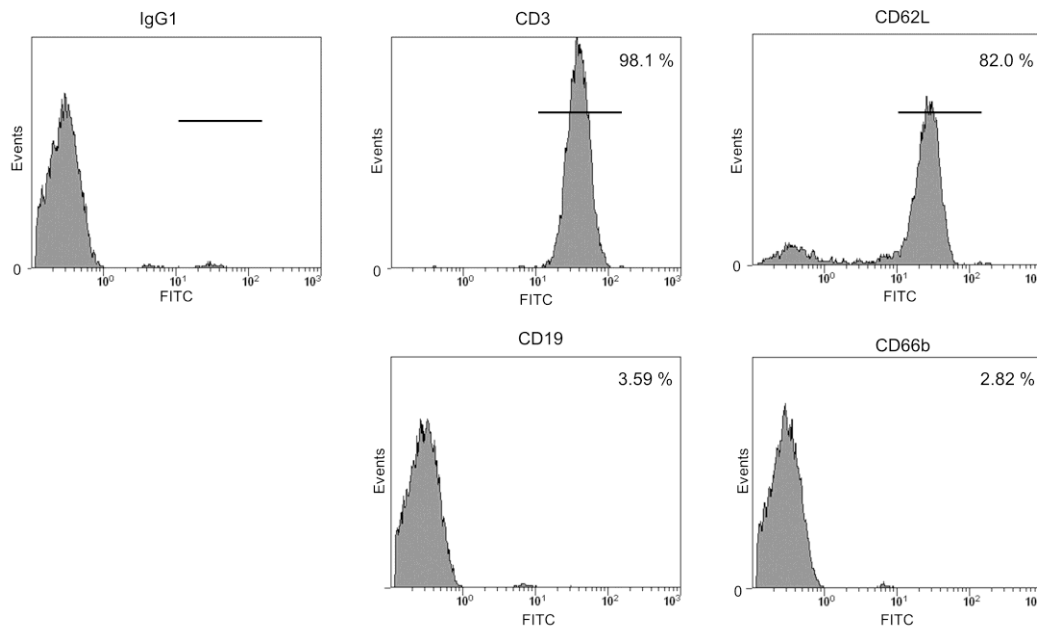


Abb. 55: Bestimmung der Expression von CD3 und CD62L in isolierten T-Lymphozyten.

Die T-Lymphozyten wurden mit einem FITC-markierten Antikörper gegen CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. FITC-markierte Antikörper gegen CD19 und CD66b dienten als Kontrollen und zeigten auf Kontamination mit B-Lymphozyten und Granulozyten hin. IgG1 diene als Isotypkontrolle.

4.4.2 Cytokinprofil von Granulozyten nach L-Selektin-Ligation

Das Cytokinexpressionsmuster von Granulozyten nach L-Selektin-Ligation mit anti-L-Selektin-Antikörpern (DREG 55 und DREG 200), Stimulation mit IL-8 oder Costimulation mit anti-L-Selektin-Antikörpern und IL-8 wurde in orientierenden Experimenten mit Hilfe von Cytokin-Antikörper-Arrays erstellt, die eine parallele Bestimmung multipler Cytokine in einem einzigen Stimulationsansatz erlauben. Für diese Untersuchungen wurde der ProteoPlex™ 16-Well Human Cytokine Array Kit verwendet, der die Bestimmung von 16 verschiedenen Cytokinen im Zellüberstand bietet.

Im Zellüberstand konnte mit Hilfe des ProteoPlex™ 16-Well Human Cytokine Array nach Costimulation mit IL-8 und DREG 55/200 eine 4,9-fache Steigerung der IL-1 β -Konzentration, im Vergleich zu IgG1-behandelten Zellen, erzielt werden (Abb. 56).

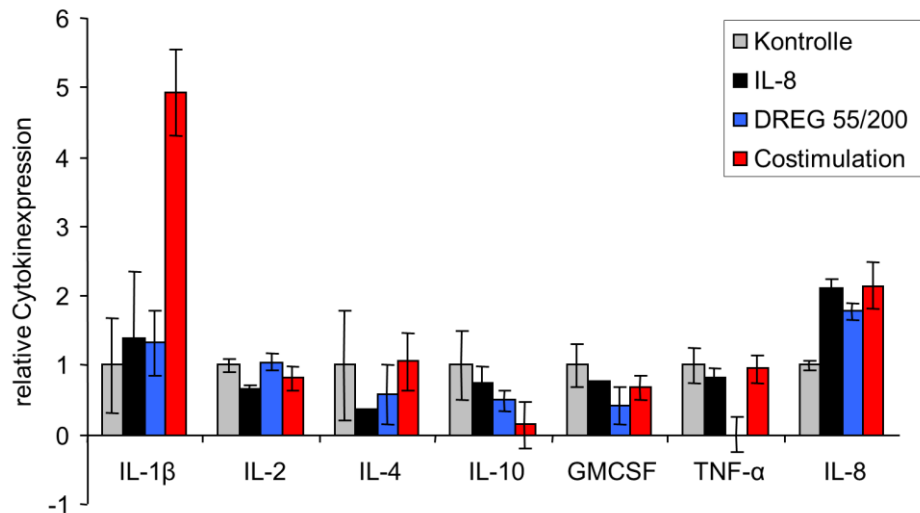


Abb. 56: Analyse der Cytokinfreisetzung von Granulozyten nach Stimulation.

Dargestellt ist die relative Expression verschiedener Cytokine nach Stimulation von Granulozyten mit IL-8, IL-8 + DREG 55/200 oder DREG 55/200, wobei nicht stimulierte Zellen als Kontrolle dienten. Die relative Cytokinexpression im Zellüberstand von stimulierten und nicht stimulierten Granulozyten wurde mittels ProteoPlex™ 16-Well Human Cytokine Array bestimmt. Die Diagramme zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von einem Experiment mit Vierfachbestimmung der Cytokinkonzentration im Zellüberstand. Die relative Cytokinexpression ist bezogen auf anti-IgG1 behandelte Zellen (Kontrolle).

4.4.3 Cytokinprofil von T-Lymphozyten nach L-Selektin-Ligation

Das Cytokinexpressionsmuster von T-Zellen nach L-Selektin-Ligation und Costimulation mit anti-CD3 wurde ebenfalls in einem orientierenden Experiment mit dem Cytokin-Antikörper-Array bestimmt.

Wie Abb. 57 zeigt, konnten in den T-Lymphozyten nach Stimulation mit anti-CD3-Antikörper oder Costimulation eine Erhöhung der Konzentration von IL-2 und IL-10 beobachtet werden. Hier führt eine Costimulation mit anti-CD3 und DREG-Antikörpern zu einer zusätzlichen Expressionssteigerung.

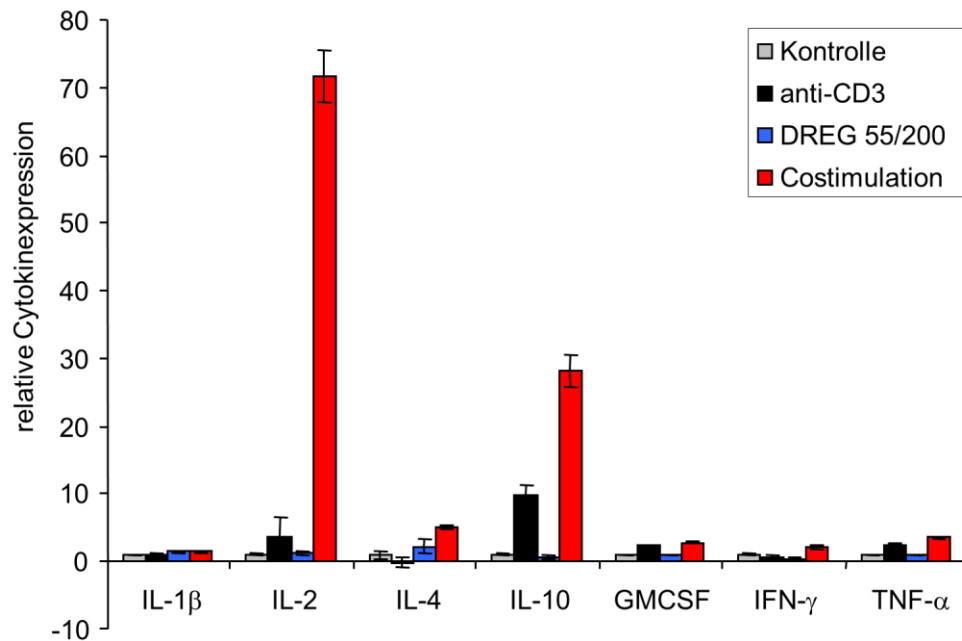


Abb. 57: Analyse der Cytokinfreisetzung von T-Zellen nach Stimulation.

Dargestellt ist die relative Expression verschiedener Cytokine nach Stimulation mit anti-CD3, anti-CD3+ DREG 55/200 oder DREG 55/200. Als Kontrolle wurden die T-Zellen nicht stimuliert. Zunächst wurden die Cytokinkonzentrationen im Zellüberstand von stimulierten und nicht stimulierten T-Zellen mittels ProteoPlex™ 16-Well Human Cytokine Array bestimmt und anschließend die relative Cytokinexpression ermittelt. Die Diagramme zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung von einem Experiment mit Vierfachbestimmung der Cytokinkonzentration im Zellüberstand. Die relative Cytokinexpression ist bezogen auf anti-IgG1 behandelte Zellen (Kontrolle).

4.5 Identifikation neuer Interaktionspartner von L-Selektin

L-Selektin ist in einer Reihe von Signaltransduktionsvorgängen involviert. Im Rahmen dieser Prozesse interagiert es über seine cytoplasmatische Domäne mit verschiedenen Proteinen (siehe Einleitung). Es sind jedoch noch weitere Bindungspartner zu erwarten, da Signallingereignisse auf der Ebene des Rezeptors und deren Regulation wenig bekannt sind. In diesem Abschnitt der Arbeit sollten Interaktionspartner von L-Selektin mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems identifiziert und anschließend charakterisiert werden. Das Yeast-Two-Hybrid-System bietet den Vorteil, eine gesamte humane Leukozyten-cDNA-Bank nach intrazellulären Interaktionspartnern durchsuchen zu können.

4.5.1 *LScyto als Bait*

4.5.1.1 Klonierung von 3x LScyto in das Baitplasmid

Zur Identifizierung von neuen Interaktionspartnern wurde zunächst die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin in das Baitplasmid kloniert. Da LScyto allerdings nur aus 17 Aminosäuren besteht und somit wesentlich kleiner wäre als die GAL4-Bindungsdomäne (147 aa), die mit dem Baitplasmid pGBKT7 exprimiert wird und LScyto während der Interaktion sterisch behindern könnte, wurde LScyto in triplikatier Form hintereinander in den Vektor pAS2-1 kloniert (Kilian, 2002). Das pAS2-1/3xLSCD-Konstrukt wurde für das Screening in den neuen Baitvektor pGBKT7 umklontiert und pGBKT7-3xLScyto benannt (Abb. 58). In diesem System wird das Baitprotein mit einem c-Myc-Epitop-tag exprimiert und kann im Western Blot mit einem anti-c-Myc-Antikörper detektiert werden.

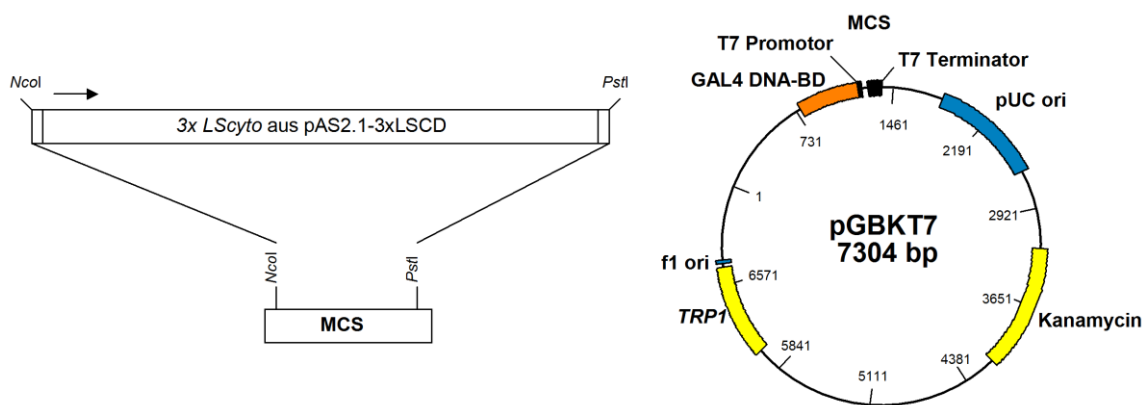


Abb. 58: Das Bait-Konstrukt pGBKT7-3xLScyto.

Die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin, die in triplikatier Form in dem Konstrukt pAS2-1/3xLSCD vorlag, wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *PstI* verdaut und in den Baitvektor pGBKT7 kloniert. MCS, Multiple Cloning Site; Kanamycin, Kanamycinresistenzgen; pUC ori, ColE1-Replikationsursprung; f1 ori, Replikationsursprung des Bakteriophagen f1; TRP1, Tryptophan-Gen; GAL4 DNA-BD, GAL4-DNA-Bindedomäne.

4.5.1.2 Nachweis der Expression von GAL4-BD-3xLScyto in *S. cerevisiae*

Zum Nachweis der erfolgreichen Expression des Baitproteins GAL4-BD-3xLScyto, wurde das pGBKT7-3xLScyto-Bait-Konstrukt zunächst in kleinem Maßstab in den *S. cerevisiae*-Stamm AH109 transformiert (siehe 3.8.3) und auf SD/-Trp-Agarplatten ausgestrichen. Aus den gewachsenen Klonen wurden Proteinlysate hergestellt, die auf die Expression des Bait-Proteins hin mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der Western Blot-Analyse untersucht wurden. Als Negativkontrolle diente Lysat von nicht-transformierten AH109.

Das *Bait*-Fusionsprotein wurde sowohl mit dem monoklonalen anti-c-Myc-Antikörper als auch mit dem polyklonalen Antikörper gegen die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin nachgewiesen. In der Western Blot-Analyse konnte mit beiden Antikörpern eine spezifische 29,3 kDa-Bande nachgewiesen werden, die in den Kontrollen fehlte (Abb. 59). Der erfolgreich mit dem *Bait*-Konstrukt transformierte und exprimierende Klon wurde zur Transformation der cDNA-Bank eingesetzt.

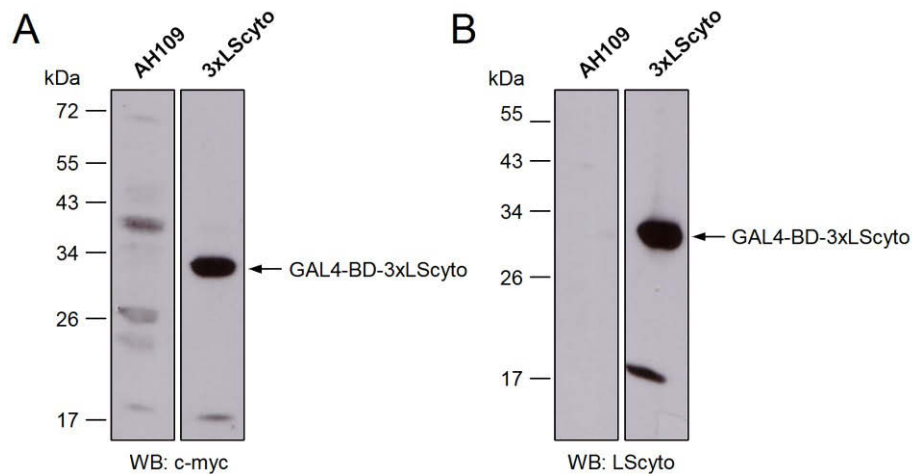


Abb. 59: Analyse der Expression des *Bait*-Fusionsproteins GAL4-BD-3xLScyto für das Yeast-Two-Hybrid-Screening.

Rohextrakt aus bereits mit dem *Bait*-Plasmid pGBKT7-3xLScyto transformierten AH109-Zellen wurde im Western Blot auf die Expression des Fusionsproteins GAL4-BD-3xLScyto mit einem anti-c-myc-Antikörper untersucht (A). Die Expression von 3xLScyto wurde mit einem LScyto-Antikörper detektiert (B). Als Kontrolle diente der untransformierte Hefestamm AH109, dessen Rohextrakt ebenfalls einer Western Blot-Analyse mit anti-c-myc-Antikörper und anti-LScyto-Antikörper unterzogen wurde.

4.5.1.3 Untersuchung auf Autoaktivierung der Reportergene durch das *Bait*-Konstrukt

Die vier Reportergene von *S. cerevisiae* AH109 stehen unter der Kontrolle GAL4-abhängiger Promotoren und codieren für die Proteine ADE2, HIS3, LacZ und MEL1.

Um auszuschließen, dass das *Bait*-Konstrukt allein, ohne die Anwesenheit eines Interaktionspartners, die Transkription dieser Reportergene aktiviert, wurde die Wachstumsfähigkeit des mit dem *Bait*-Konstrukt transformierten *S. cerevisiae* AH109 auf verschiedenen Minimalagarplatten untersucht. Hefestämmen können unterschiedliche Basalexpression ihres *HIS3*-Reportergens zeigen. So ist für den *S. cerevisiae*-Stamm Y190 eine hohe *HIS2*-Basalexpression bekannt, wobei AH109 eine geringe Basalexpression aufweist. Auch das verwendete *Bait*-Plasmid spielt dabei eine Rolle. Mit dem *Bait*-Konstrukt pGKT7-3xLScyto transformierte AH109 zeigten jedoch kein Wachstum auf

SD/-Trp/-His und SD/-Trp/-His/-Ade-Platten (Abb. 60). So war der Einsatz von 3-AT, einem kompetitiven Inhibitor des *HIS3*-Genprodukts (Bai und Elledge, 1997), auf Minimalagarplatten ohne Histidin nicht nötig, wurde dennoch in einer Konzentration von 2 mM den Screenplatten zugegeben, um eine mögliche Hintergrundexpression von *HIS3* völlig auszuschließen.

Das Reportergen *lacZ* codiert für eine β -Galaktosidase und *MEL1* für eine α -Galaktosidase. Sie hydrolysieren X- β -Gal bzw. X- α -Gal, wodurch ein blauer Indigo-Farbstoff entsteht. Da MEL1 von den Hefezellen sezerniert wird, sollte die Expression von MEL1 auf X- α -Gal enthaltendem Agar nachweisbar sein und Hinweis auf die Aktivierung der MEL-Expression geben (Lazo et al., 1977). Auch hier zeigte AH109, transformiert mit pGBKT7-3xLScyto, keine Blaufärbung auf SD/-Trp/Gal/Raf/X- α -Gal-Agarplatten und somit keine Aktivierung der α -Galaktosidase (Abb. 60 und Tab. 13).

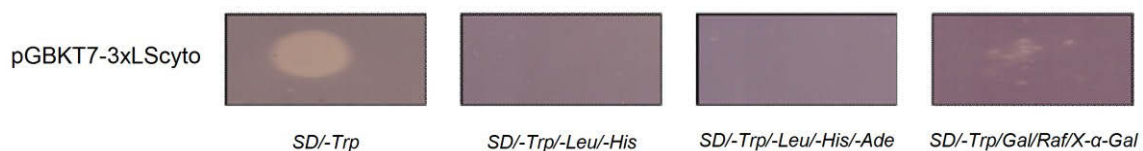


Abb. 60: Überprüfung der Autoaktivierung des *Bait*-Konstrukts pGBKT7-3xLScyto.

Der Hefestamm AH109, der mit dem Baitkonstrukt transformiert wurde, wurde auf verschiedenen Selektionsplatten aufgebracht und drei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Ergebnisse des Wachstums auf den Selektionsplatten sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Aktivierungstest der chromosomalen Reportergene *TRP1*, *HIS3*, *ADE2* und *MEL1* durch das GAL4-BD-3xLScyto-Fusionsprotein. Die Reportergene stehen unter der Kontrolle GAL-abhängiger Promotoren. *HIS3* und *ADE2* vermitteln Auxotrophie für Histidin bzw. Adenin. *MEL1* codiert für eine α -Galaktosidase, welche X- α -Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzt.

Reporter	Selektionsplatte	beobachteter Phänotyp AH 109 (pGBKT7-3xLScyto)	Erwarteter Phänotyp
<i>TRP1</i>	SD/-Trp	Wachstum	Wachstum
<i>HIS3</i>	SD/-Trp/-Leu/-His	Kein Wachstum	Kein Wachstum
<i>HIS3/ADE2</i>	SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade	Kein Wachstum	Kein Wachstum
<i>MEL1</i>	SD/-Trp/Gal/Raf/X- α -Gal	Wachstum, keine Blaufärbung	Wachstum, keine Blaufärbung

4.5.1.4 Test auf Toxizität des *Bait*-Konstrukts

Eine wichtige Voraussetzung für einen erfolgreichen Yeast-Two-Hybrid-Screen ist das unbegrenzte Wachstum von Hefezellen. Daher ist es notwendig, eine mögliche Toxizität des *Bait*-Konstrukts auszuschließen. Dazu wurden die transformierten Hefezellen in

SD/-Trp-Medium bei 30 °C und 230 rpm kultiviert und stündlich die OD bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen. Die letzte Messung erfolgte nach 24 h und ergab eine OD_{578} von 1,47 für pGBKT7-3xLScyto und eine OD_{578} von 1,6 für pGBKT7 (Leervektor). Als Vergleich wurde der Wachstumsverlauf von nicht transformierten AH109-Zellen in YPDA-Medium beobachtet und ergab nach 24 h eine OD_{578} von 1,75. Die mit dem *Bait*-Konstrukt transformierten AH109-Zellen wuchsen etwas langsamer als nur mit dem jeweiligen Leervektor transformierte Zellen (Abb. 61). Nach Angaben von Clontech Laboratories Inc. (*Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits, User Manual*) muss aber erst bei einer OD_{600} von unter 0,8 (entspricht einer OD_{578} von 0,83) nach 16-24 h von einer Toxizität des *Bait*-Konstrukts ausgegangen werden.

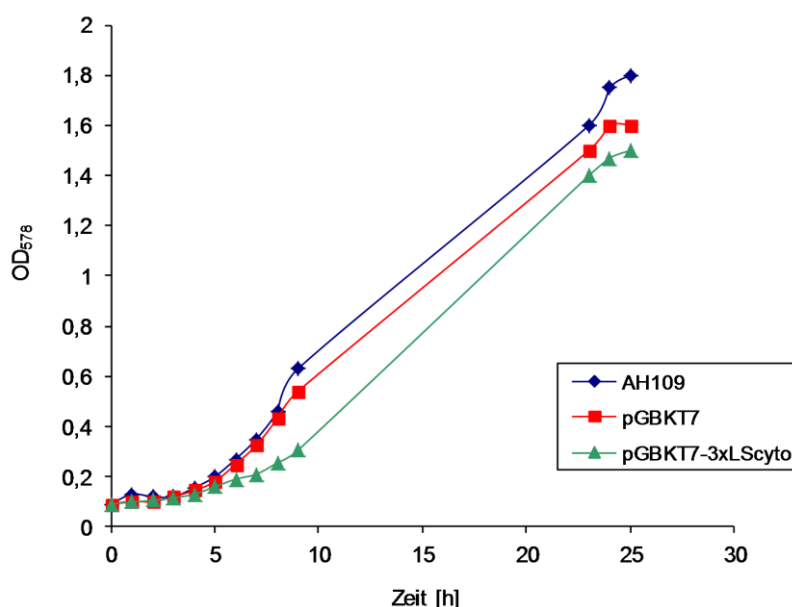


Abb. 61: Prüfung des *Bait*-Konstrukts auf eine mögliche Toxizität.

Der Hefestamm AH109 wurde mit dem *Bait*-Konstrukt transformiert und in SD/-Trp-Medium bei 30 °C kultiviert. Es wurde stündlich die optische Dichte (Absorption) bei 578 nm gemessen, wobei die letzte Messung nach 24 h durchgeführt wurde. Die gemessenen Absorptionswerte in den jeweiligen Zeitpunkten wurden in einem Diagramm dargestellt. Als Kontrollen dienten mit dem jeweiligen Leervektor transformierte und untransformierte AH109-Zellen. Die untransformierten Hefezellen wurden in YPDA-Medium kultiviert.

4.5.2 Screening mit pGBKT7-3x-LScyto

4.5.2.1 Charakterisierung der humanen Leukozyten-cDNA-Bank

Eine cDNA-Bank wird aus dem Gewebe generiert, in dem das *Bait*-Protein eine biologische Funktion hat (Golemis und Khazak, 1997). Für die hier vorliegenden

Untersuchungen der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin wurde die cDNA-Bank aus humanen Leukozyten generiert. Dazu wurden aus humanem Vollblut die Erythrozyten lysiert, die Gesamt-RNA isoliert und zur qualitativen Analyse eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Die beiden rRNA-Untereinheiten (28S- und 18S-rRNA) lagen in einer guten Ausbeute vor und zeigten keine Abbaubanden, so dass von einer guten Qualität der isolierten Gesamt-RNA ausgegangen werden kann (Abb. 62).

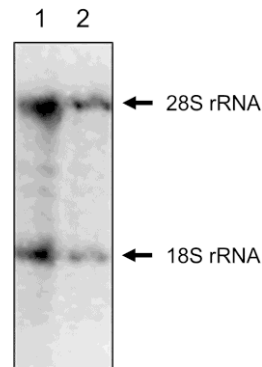


Abb. 62: Kontrolle der Gesamt-RNA-Präparation.

Die isolierte Leukozyten-RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Spur 1: Eluat 1, konzentriert; Spur 2: Eluat 2, konzentriert. Die beiden Banden stellen die 18 S- und die 28 S-rRNA dar und zeigen die erhaltene Integrität der RNA an.

Die isolierte Leukozyten-RNA wurde im nächsten Schritt mit Hilfe von Oligo(dT)-Primer und der Reversen Transkriptase zu einer Einzelstrang-cDNA amplifiziert. Es zeigt sich, dass die Reaktion erfolgreich war, da ein deutlicher DNA-„Schmier“ detektiert werden konnte (Abb. 63A). Dieser „Schmier“ deutet darauf hin, dass viele verschiedene Fragmente in unterschiedlichen Größenordnungen (0,1 bis 10 kb) amplifiziert wurden. Die Größenverteilung ist ein kritischer Punkt für die erfolgreiche Generierung einer cDNA-Bank.

In der folgenden *Long Distance*-PCR wurde mit Hilfe von 5'- und 3'-PCR-Primern aus Einzelstrang-cDNA eine Doppelstrang-cDNA hergestellt, die im Anschluss zur Entfernung von Fragmenten <100 bp über eine Silikagelsäule gereinigt wurde (siehe 3.1.2.4). Auch hier ist ein „Schmier“ in einer sehr weiten Größenordnung zu verzeichnen (Abb. 63B).

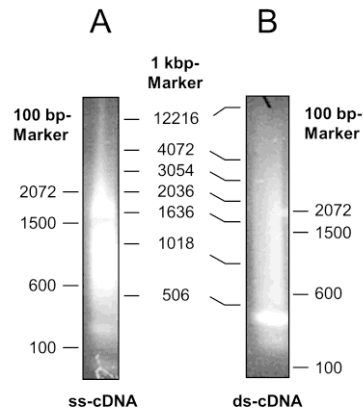


Abb. 63: Ergebnis der Einzelstrang- und Doppelstrang-cDNA-Synthese.

(A) Aus der isolierten Leukozyten-RNA wurde mit Hilfe des Oligo(dT)-Primers und der Reversen Transkriptase die Einzelstrang (ss)-cDNA amplifiziert. 4 μ l aus einem Doppelansatz wurden auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Ethidiumbromidfärbung. (B) 4 μ l der amplifizierten Doppelstrang (ds)-cDNA wurden auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen, gelelektrophoretisch getrennt und durch Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen. Ein kontinuierlicher „Schmier“ zwischen 0,1 und 10 kb wurde detektiert.

4.5.2.2 Screening nach Interaktionspartnern von LScyto

Die vorherigen Untersuchungen (Autoaktivierung, Proteinexpression, Toxizitätstest) haben gezeigt, dass das pGBKT7-3xLScyto-Konstrukt als *Bait* für den Yeast-Two-Hybrid-Screen geeignet ist. Die Leukozyten-cDNA-Bank und der linearisierte *Prey*-Vektor wurden in den Hefestamm AH109 transformiert, der bereits den *Bait*-Vektor enthielt. Der Hefescreen wurde wie unter 3.8.7 beschrieben insgesamt dreimal durchgeführt, wobei im ersten Screen das *Prey*-Plasmid pGADT7-Rec2 und im zweiten/dritten Screen das *Prey*-Plasmid pGADT7-Rec verwendet wurden. Beide *Prey*-Plasmide wurden *Sma*I-linearisiert und sind von der Firma so konstruiert, dass zelluläre Rekombinasen der Hefe die ds-cDNA verwenden, um die Lücke in den *Prey*-Plasmiden zu schließen. Zur Selektion von interagierenden Proteinen wurden die Screenansätze auf SD/-Trp/-Leu/-His/2 mM 3-AT-Platten ausgestrichen. Nach einer Wachstumszeit von einer Woche ergaben sich im ersten Screen drei und im zweiten Screen zwei Klone, die einer weiteren Selektion auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade- und SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/Gal/Raf/X- α -Gal-Agarplatten unterzogen wurden. Dadurch wurden die Klone auf die Aktivierung weiterer Reportergene hin untersucht und die Zahl möglicher falsch positiver Klone verringert. Als Positivkontrolle wurde in den Screenings mit pGBKT7-p53 und pGADT7-Rec-T co-transformierte AH109-Zellen benutzt, da im Yeast-Two-Hybrid-System die Interaktion zwischen dem murinen p53 und dem großen T-Antigen des SV40-

Virus nachgewiesen werden konnte (Iwabuchi et al., 1993; Li und Fields, 1993). Alle Klone wuchsen auf Adenin-Mangelplatten und sezernierten, außer Klon Nr. 1 von Screen 2, die α -Galaktosidase, die an der Blaufärbung der Klone zu erkennen ist (Abb. 64A und B). Diese stellten potenzielle Interaktionskandidaten dar und wurden weiter untersucht.

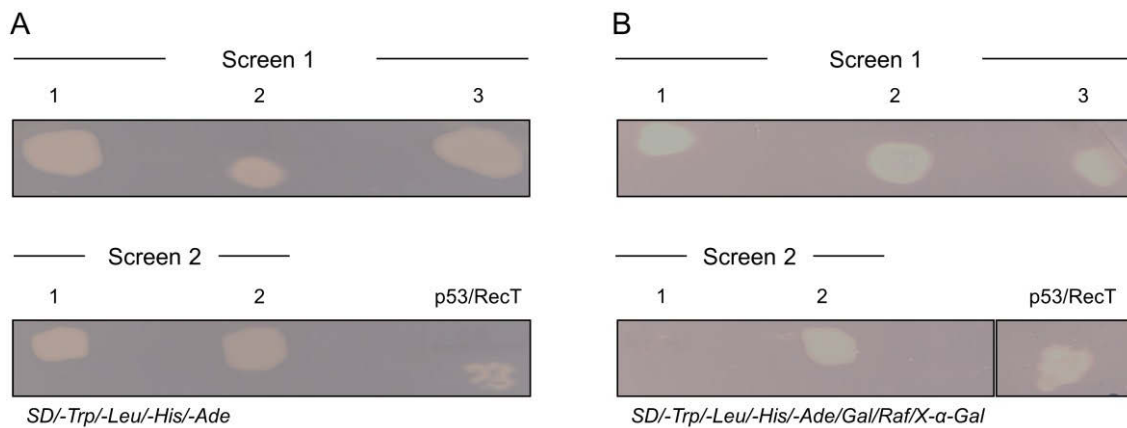


Abb. 64: Koloniewachstum nach Transformation von pGADT7-Rec2/cDNA-Bank bzw. pGADT7-Rec/cDNA-Bank in pGBKT7-3xLScyto enthaltende AH109.

(A) Wachstum der detektierten Kolonien von zwei Screeningversuchen nach Selektion auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade; (B) Koloniewachstum der unter (A) positiven Klone nach Selektion auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/Gal/Raf/X- α -Gal. Als Positivkontrolle dienten mit pGBKT7-p53 und pGADT7-Rec T co-transformierte AH109-Zellen.

4.5.2.3 Identifizierung der isolierten cDNA-Klone

Die *Bait*- und *Prey*-Plasmide der Interaktionskandidaten wurden durch Plasmidpräparation aus den Hefezellen isoliert, in *E. coli* transformiert und auf Ampicillinplatten ausgestrichen. Da nur das *Prey*-Konstrukt ein Ampicillinresistenzgen besitzt, wachsen auf den Bakterienplatten nur die Klone, die dieses Konstrukt besitzen. Die Inserts der durch Mini-Präparation gewonnenen *Prey*-Plasmide wurden mittels flankierender Primer (5' AD LD-Primer und 3' AD LD-Primer) in einer PCR-Reaktion amplifiziert.

Alle drei Klone vom ersten Screening zeigten unterschiedliche Fragmentgrößen auf (Abb. 65A). Das 650 bp große Fragment von Klon 1, das 1,2 kb große Fragment von Klon 2 und das 800 bp große Fragment von Klon 3 aus dem ersten Screening wurden anschließend in den pJET1.2-Vektor subkloniert und sequenziert.

Beide Klone vom zweiten Screening wurden für die Feststellung der Fragmentgrößen *EcoRI/BamHI* verdaut und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 65B). Beide Klone zeigten die gleiche Fragmentgröße von 900 bp auf, was darauf hindeuten würde, dass es sich um das gleiche Fragment handelt. Die Inserts wurden

hierbei nicht subkloniert, sondern gleich mit den Vektorprimern der LD-PCR oder der Einzelstrangsynthese sequenziert. Alle erhaltenen Sequenzen wurden mit dem BLASTN-Programm von NCBI analysiert. Die cDNA-Insert-Sequenzen der drei Klone vom ersten Screening lagen entweder außerhalb bekannter codierender Sequenzregionen oder konnten aufgrund schwer sequenzierbarer Bereiche nicht gut gelesen werden. Demgegenüber zeigten die beiden Klone vom zweiten Screening Homologien zur 1124 bp großen zweiten Isoform des *Filamin-Binding LIM Protein 1* (FBLP-1).

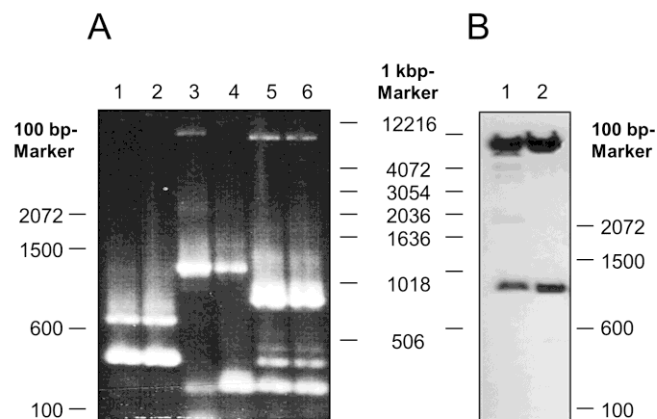


Abb. 65: Gelelektrophoretische Analyse der amplifizierten cDNA-Fragmente und des *EcoRI/BamHI*-Restriktionsverdaus von isolierten Prey-Plasmiden.

(A) Mit Hilfe der flankierenden Primer 5' AD LD und 3' AD LD wurden die DNA-Fragmente der positiven Klone des ersten Screenings amplifiziert und je 1 µl des PCR-Produktes auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen. 1+2, Klon 1; 3+4, Klon 2; 5+6, Klon 3. (B) Etwa 1 µg isolierte Prey-Plasmide der positiven Klone des zweiten Screenings wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* verdaut und auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen. Die obere Bande bei ca. 8 kb stammt von dem linearisierten pGADT7-Rec-Vektor, die unteren Banden bei ca. 900 bp von dem klonierten cDNA-Fragment. 1, Klon 1; 2, Klon 2.

4.5.3 Charakterisierung des *Filamin-Bindeproteins 1* (FBLP-1)

Im Yeast-Two-Hybrid-Screen wurde mit Hilfe der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin als *Bait* ein 900 bp großes Fragment gefischt, das für das Protein FBLP-1 codierte. Abb. 66 zeigt die Homologie des Sequenzabschnitts 1248-1497 bp vom FBLP-1 mit dem ersten positiven Klon des zweiten Screenings. Auch das cDNA-Fragment vom zweiten Klon codierte für FBLP-1.

Um die Interaktion weiter zu verifizieren, wurde versucht, FBLP-1 mit Hilfe einer One-Step-RT-PCR aus einer cDNA-Bank zu generieren. Es wurde ein 900 bp großes Fragment amplifiziert (Abb. 67) und in den Vektor pJET1.2 *blunt* subkloniert. Sequenzanalysen und die Tatsache, dass das *FBLP-1*-Gen eine Größe von 1124 bp besitzt, zeigten, dass es sich

dabei nicht um *FBLP-1* handelte. Ein Vergleich der Sequenzen der One-Step-RT-PCR-Primer in der Nukleotiddatenbank von NCBI zeigte jedoch, dass der Primer FBLIM-1 NdeI fwd nicht ausreichend spezifisch für das *FBLP-1*-Gen war. Die Amplifizierung von *FBLP-1* mit einem spezifischen Vorwärtsprimer, Expression des Proteins sowie der direkte Nachweis der Bindung an L-Selektin durch verschiedene biochemische Methoden, sind weitere Ziele, die noch anstehen.

```

Sequenz X   GGCCGGGCTGTGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTGGA : 86
FBLP-1      GGCTGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTGGA : 1297
            GGC GGG G GGTGGCTCAC CCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGTGGA

Sequenz X   TCATGAGGTCAGGCGATCCAGACCATCTGGCTAACAAGGTGAAAGCCCATCTCTACTAA : 146
FBLP-1      TCACGAGGTCAGGAGATCCAGATCATCTGGCTAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAA : 1357
            TCA GAGGTCAGG GATC AGA CAT CTGGCTAACA GGTGAAA CCC TCTCTACTAA

Sequenz X   AAATACAAAAA---TTAGCCGGGCATGGCAGTAGGTGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGA : 203
FBLP-1      AAATACAAAAAATAATTAGCCAGGCATGGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGA : 1417
            AAATACAAAAA TTAGCC GGCATGG G GG GCCTGTAGTCCCAGCTACTC GGA

Sequenz X   GGCTGAGGCAGGAAGAATGGCG-GAACC GGGAGGG-GAGCTGTCAG-GAACCGAGATTAG : 260
FBLP-1      GGCTGAGGCAGGAGAATGGCGTGAACCTGGGAGGCAGAGCTTGCAGTGAGCCGAGATCA- : 1476
            GGCTGAGGCAG AGAATGGCG GAACC GGGAGG GAGCTTGCAG GA CCGAGAT A

Sequenz X   CACC-CTGCACTCCAGCCTGG : 280
FBLP-1      CGCCACTGCACTCCAGCCTGG : 1497
            C CC CTGCACTCCAGCCTGG

```

Abb. 66: Vergleich der Nukleotidsequenzen des unbekannten 900 bp großen Fragments mit dem humanen *FBLP-1*-Gen.

Gezeigt ist der Sequenzabschnitt 1248-1476 bp der zweiten Isoform des FBLP-1-Proteins, der 88 % Identität und 53 % Ähnlichkeit zu der Sequenz des Fragments von # 1 und # 2 (Screening 2) zeigt. Identische Nukleotide sind mit schwarzer Farbe, unterschiedliche mit grauer Farbe unterlegt. Die codierenden Bereiche der zweiten Isoform von FBLP-1 liegen zwischen den Basenpaaren 208 und 1332.

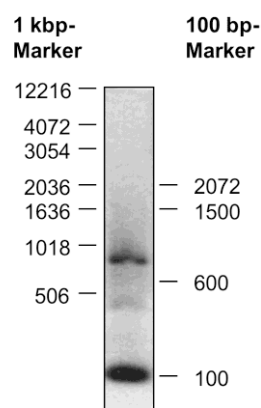


Abb. 67: Gelelektrophoretischer Nachweis des One-Step-RT-PCR-Produktes aus einer Leukozyten-cDNA-Bank.

Mit Hilfe der Primer FBLIM-1 NdeI fwd und FBLIM-1 XhoI rev wurde bei 50 °C Annealingtemperatur und 30 Zyklen der potentielle Interaktionspartner vom Yeast-Two-Hybrid-Screening amplifiziert.

5 DISKUSSION

5.1 Interaktionen der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin

Die Infiltration von Leukozyten in entzündete Gewebe wird durch eine Reihe von Adhäsions- und Aktivierungsereignissen reguliert. Neben dem *Tethering* und dem *Rolling* von Leukozyten auf dem Endothel vermitteln Selektine auch Signale in die Zelle. Die Stimulation von L-Selektin durch physiologische Glykoproteinliganden, Sulfatide oder monoklonale Antikörper führt zur Aktivierung einer Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden. Darüber hinaus wird L-Selektin auch von intrazellulären Signalgebungsereignissen reguliert. In diesem Zusammenhang konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Behandlung von Jurkat T-Lymphozyten mit Phorbol ester (PMA) eine PKC-abhängige Serinphosphorylierung des L-Selektin-Moleküls induziert (Haribabu et al., 1997; Kilian et al., 2004). Die Regulation der Phosphorylierung wird über eine abwechselnde Bindung von Calmodulin und PKC realisiert, was mit einer überlappenden Bindestelle in Zusammenhang steht (Kahn et al., 1998). Die Entdeckung von PhapII als einem bislang unbekannten Interaktionspartner von L-Selektin ließ neben dem Modell der koordinierten L-Selektin-Regulation durch PKC und Calmodulin auf eine zusätzliche Regulationsebene schließen (Kilian, 2002). Die Bindung von PhapII erfolgt nahezu ausschließlich an die nicht phosphorylierte cytoplasmatische Domäne von L-Selektin und weist damit auf eine regulatorische Funktion von PKC hin (Kilian, 2002). Darüber hinaus ist PhapII ein Inhibitor von PP2A (Li et al., 1996). Bei PP2A handelt es sich um eine wichtige Serin-Threonin-Phosphatase, die sowohl in einer Reihe von Dephosphorylierungsvorgängen von PKC-Substraten als auch von PKC selbst involviert ist (Janssens und Goris, 2001; Sim und Scott, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Serin-phosphoryliertes L-Selektin ein Substrat für PP2A darstellt. PP2A scheint eine Rolle in der zellulären Dephosphorylierung von L-Selektin zu spielen. Hierauf weist die Beobachtung hin, dass die Dephosphorylierung mit okadaischer Säure, einem Phosphatase-Inhibitor, extrahiert aus den Dinoflagellaten *Prorocentrum sp.* und *Dinophysis sp.* (Bialojan und Takai, 1988), blockiert werden konnte. *In vitro* kann die inhibitorische Wirkung der okadaischen Säure auf PP2A schon ab einer Konzentration von 1-2 nM nachgewiesen werden, während die Blockierung anderer Serin-Threonin-Phosphatasen wie PP1 oder PP2B erst ab einer Konzentration von 1 µM oder mehr geschieht (Bialojan und Takai, 1988). In Dephosphorylierungsassays der vorliegenden

Arbeit blockierte okadaische Säure bei einer Konzentration von 1 nM die Aktivität der PP2A um etwa 25 %, bei 100 nM lag dieser Wert um 89 %. Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von NIPP-1, einem PP1 spezifischem Inhibitor, zu keiner signifikanten Reduktion der L-Selektin-Dephosphorylierung, was auf PP2A als die maßgebliche Phosphatase für die Dephosphorylierung von L-Selektin hinweist. Die Dephosphorylierung von L-Selektin durch PP2A konnte auch durch PhapII, einem physiologischen Inhibitor, inhibiert werden. Der Mechanismus, wie PhapII spezifisch mit der katalytischen Aktivität von PP2A interferiert, ist hingegen noch unklar. Bekannt ist jedoch, dass die inhibitorische Aktivität von PhapII für PP2A spezifisch ist, da ein Einfluss auf die Aktivität anderer Protein-Phosphatasen wie PP1, PP2B und PP2C nicht nachgewiesen werden konnte (Li et al., 1995).

Die N-terminale Region von PhapII, also der Bereich zwischen den Aminosäuren 25 und 119, ist für die Inhibition von PP2A von essenzieller Bedeutung. Überdies ist in diesem Bereich die Dimerisierungsdomäne lokalisiert (aa 21-65) (Saito et al., 1999). Diese besteht aus einer Grundgerüsthelix, die durch hydrophobe Interaktion in antiparalleler Weise mit einer zweiten Grundgerüsthelix ein Dimer formt (Muto et al., 2007). Die Aufhebung der Dimerisierung durch den Austausch von hydrophoben gegen hydrophile Aminosäurereste in diesem Bereich (aa 38, 40, 45 und 49) hat keinen Einfluss auf die Inhibition von PP2A (Saito et al., 1999). Ferner konnte durch Radiosequenzierungsanalysen Ser-9 und Ser-24 als Phosphorylierungsstellen von PhapII in verschiedenen humanen Zelllinien (HUT-102, HUT-78, MT-2, H-9, TL-Su, Jurkat, Raji, K-562, HL-60, HOS, HeLa) identifiziert werden (Adachi et al., 1994). Die um Ser-9 und Ser-24 liegenden Sequenzen zeigen eine apparente Konsensussequenzstelle für Proteinkinase C. Tyrosinkinasen scheinen bei der Phosphorylierung von PhapII keine Rolle zu spielen, da kein Phosphotyrosin nachgewiesen werden konnte. Entgegen den Befunden von ten Klooster et al. (2007) führte die Vortäuschung einer strukturellen Phosphorylierung durch den Austausch von Ser-9 gegen Glutamat in PhapII nicht zu einem Verlust der Dimerbildung. Diese Veränderung schien vielmehr einen Einfluss auf die Konformation des Proteins zu haben und diese in Richtung einer kompakten und geordneteren Struktur zu begünstigen (siehe Kapitel 5.2.1, Tab. 14). In der Gelfiltrationschromatographie zeigte sich sowohl bei der phosphomimetischen Mutante PhapII S9E als auch bei der phosphodefizienten Mutante PhapII S9A ein zweiter Peak, der als ein PhapII-Protein mit einem kleineren Stokes-Radius interpretiert wurde. Entsprechend der erhöhten Kompaktheit zeigte sich ein

schnelleres Laufverhalten der beiden mutierten Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Protein während der nativen PAGE (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Ser-9-Mutation einen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität von PhapII hat, da die Mutationsstelle in Nachbarschaft zu der bekannten PP2A-Inhibitor-domäne liegt. Vorläufige Experimente deuten auf eine erhöhte PP2A-Inhibitoraktivität beider Ser-9-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp hin (Abb. 18); dies steht möglicherweise mit der kompakteren Konformation der Ser-9-Mutanten in Zusammenhang. Somit scheint die Imitierung einer strukturellen Phosphorylierung an Ser-9 eher keine Rolle bei der Bindung und Inhibition von PP2A zu spielen.

Die Identifizierung von potenziellen Serin-, Threonin- und Tyrosinphosphorylierungsstellen mit Hilfe verschiedener Datenbankanalysen ergab (siehe 3.9 Software und Datenbanken), dass einige wenige Phosphorylierungsstellen im N-terminalen, weit mehr jedoch im zentralen Bereich von PhapII liegen. So konnte Kilian (unveröffentlichte Daten) zeigen, dass das Deletionsprotein PhapII 1-119 nicht, PhapII 1-223 schwach und PhapII 120-277 gut von PKC α und PKM (*pyruvate kinase, muscle*) phosphoryliert werden. Eine Serinphosphorylierung von PhapII nach Behandlung von Jurkat T-Zellen mit PMA, einem Stimulus, das PKC aktivieren kann, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Protein Phosphatase 2A dephosphoryliert nicht nur L-Selektin an Serinresten, sondern kann auch mit nicht phosphoryliertem LScyto interagieren. Diese Interaktion konnte in Bindungsstudien mittels GST-Pull-Down-Assay und Oberflächenplasmonresonanz (SPR) als eine direkte Bindung charakterisiert werden. Es ist möglich, dass PP2A und PhapII gleichzeitig an die nicht phosphorylierte cytoplasmatische Domäne von L-Selektin gebunden vorliegen. Die Bindung zwischen PP2A und PhapII wird durch die Stimulation mit PMA verstärkt und nimmt nach längerer Stimulation wieder ab (Abb. 15). In ruhenden Mastzellen konnte nachgewiesen werden, dass im Cytosol PP2A mit PKC α assoziiert vorliegt und beide nach PMA-Stimulation an die Zellmembran translozieren (Boudreau et al., 2002; Ludowyke et al., 2000; Mochly-Rosen, 1995), was die Interaktion mit PhapII vermindern könnte. So könnte PP2A nach der Translokation an die Zellmembran an der Hemmung von PKC α -vermittelten Phosphorylierungsvorgängen beteiligt sein, indem sie PKC α durch Dephosphorylierung inaktiviert oder auch andere PKC-Substrate, die auch meist Substrate der PP2A darstellen, dephosphoryliert. Dabei könnte PP2A auch die phosphorylierte cytoplasmatische Domäne von L-Selektin dephosphorylieren. Ein zusätzlicher Dephosphorylierungsschritt an Ser-364 von L-Selektin ist wahrscheinlich

auch notwendig, damit das Shedding von L-Selektin effizient ablaufen kann (Killock und Ivetic, 2010). PP2A könnte dabei einen möglichen Kandidaten darstellen.

Die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin nach Stimulation mit PMA ist PKC-abhängig (Kilian et al., 2004). Möglich ist, dass PhapII, das bis zur Phosphorylierung von LScyto an diese Domäne gebunden vorliegt und selbst auch ein PKC-Substrat ist, von der Proteinkinase C zeitlich verzögert phosphoryliert wird. Zwischen den beiden Phosphorylierungsschritten könnte das phosphorylierte LScyto akkumulieren, so dass nachfolgende Signaltransduktionsereignisse initiiert werden können. Wie die Funktion von L-Selektin über die Phosphorylierung seiner cytoplasmatischen Domäne an Serinresten beeinflusst wird, ist nicht vollständig verstanden. Bekannt ist, dass die Behandlung von T-Zellen mit PKC-Inhibitoren während PMA-Stimulation oder TCR-Crosslinking deren Bindung an HEV vermindert, bedingt durch einen Verlust der L-Selektin-Bindungsaktivität (Haribabu et al., 1997; Spertini et al., 1991).

An der Interaktion der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin und PhapII spielen die membranproximalen Aminosäurereste Arg-356 bis Arg-366 von L-Selektin eine essenzielle Rolle (Kilian et al., unveröffentlichte Daten). Besonders der Austausch der basischen Dubletts Arg-356-Arg-357 und Lys-359-Lys-360 geht mit dem Verlust der PhapII-Bindung einher. Jedoch scheint auch die komplette Deletion bis zu den membrandistalen basischen Dubletts die Interaktion mit PhapII zu beeinträchtigen und zeigt die Wichtigkeit der kompletten cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin für die PhapII-Bindung (Abb. 7). PhapII bindet über seinen C-Terminus an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin (Kilian et al., unveröffentlichte Daten). Dieser Bereich besteht überwiegend aus sauren Aminosäureresten wie Aspartat und Glutamat und nimmt keine geordnete Struktur ein (siehe 5.2.1). Möglicherweise wird durch die Bindung an LScyto eine geordnete Konformation induziert, für deren Bildung die gesamte cytoplasmatische Domäne von L-Selektin benötigt wird. Allerdings scheint nicht der komplette saure C-terminale Bereich von PhapII an der LScyto-Bindung beteiligt zu sein. In Bindungsstudien mittels SPR hatte eine Deletion von 20-40 Aminosäureresten vom C-Terminus her keinen Einfluss auf die Binding von PhapII an LScyto. Die Bindungssignale waren allerdings vermindert, auch mit der geringeren molaren Masse der Deletionsproteine zusammenhängen kann, da im SPR-System das Bindungssignal des Analyten sich proportional zu seiner molaren Masse verhält (Abb. 10). Die C-terminalen 40 Aminosäurereste scheinen die Affinität von PhapII zu LScyto zu erhöhen, bedingt

durch die Erhöhung der Assoziationsrate (Tab. 12). Vermutlich hat die Konformation Einfluss auf die schnelle Bindung an LScyto. Tatsächlich zeigten die Deletionsproteine PhapII 1-257 und PhapII 1-247 eine veränderte Konformation, hin zu einer kompakteren Struktur, zu entnehmen aus den erniedrigten Stokes-Radien im Vergleich zu PhapII VL (Tab. 14). Eine Deletion bis zu der Aminosäure 227 führte allerdings komplett zu einem Verlust der Bindung an LScyto. Ser-9-Mutationen zeigten auch eine herabgesetzte Bindung zu LScyto, was hier ausschließlich auf die veränderte Konformation des PhapII-Proteins zurückzuführen ist (Tab. 14). Diese Ergebnisse zeigen, dass neben dem sauren C-Terminus ebenfalls das N-terminale Ser-9 eine Rolle bei der Bindung von PhapII an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin spielen könnte.

5.2 Versuche zur Co-Kristallisation von PhapII in Komplex mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin

5.2.1 *Expression von PhapII in E. coli*

Für die Kristallisation von PhapII im Komplex mit LScyto müssen beide Proteine in reiner Form vorliegen. Aufgrund der kleinen molaren Masse von 2,1 kDa erwies es sich jedoch als schwierig, das LScyto-Peptid in ausreichender Menge heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Daher kam synthetisch hergestelltes LScyto in Milligramm-Maßstab zum Einsatz. Für die heterologe Expression von PhapII in *E. coli* und in eukaryotischen Systemen standen verschiedene Konstrukte zur Verfügung. Die Expression dieser Konstrukte führte in initialen Versuchen zu einer unzureichenden Menge des Proteins, was die Etablierung eines besseren Expressions- und Reinigungssystems für PhapII notwendig machte.

Für die Kristallisation von Proteinen werden im Allgemeinen große Mengen des zu untersuchenden Proteins benötigt. So schien es naheliegend, PhapII zunächst in einem prokaryotischen Expressionssystem, das in der Regel größere Proteinmengen liefert, herzustellen. In *E. coli* können die Proteinmengen rekombinant exprimierter Proteine mehr als 50 % der totalen Zellmasse erreichen (de Marco et al., 2005; Viitanen et al., 2003). Die Proteinexpression in *E. coli*-Stämmen ist ferner mit weniger Kosten und Zeitaufwand verbunden (Graumann und Premstaller, 2006). Die Expression des PhapII-Proteins erfolgte zunächst mit dem auf der T7-RNA-Polymerase basierten pET22b(+)-System (Weickert et al., 1996), das ein Protein mit einem C-terminalen His₆-tag erzeugt, welches dann über Affinitätschromatographie isoliert werden kann. Die Verwendung der

T7-RNA-Polymerase ermöglicht eine große Ausbeute des rekombinanten Proteins. Darüber hinaus werden unter der Kontrolle des T7-Promotors stehende Zielgene nicht von der *E. coli*-Polymerase erkannt, was eine spezifische Expression ermöglicht (Studier und Moffatt, 1986; Studier et al., 1990). Zur Expression wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS eingesetzt, der das Lysozym des Bakteriophagen T7 exprimiert, einem natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase, und so die basale Expression des Zielproteins über die T7-RNA-Polymerase reduzieren kann (Studier, 1991). Zum anderen besitzt dieser Stamm zusätzliche tRNAs für sechs Codone, die in *E. coli* selten vorkommen (Li et al., 2003). Die Expression im pET22b(+)-System erwies sich jedoch als ungeeignet, da gleichzeitig mit dem PhapII-Protein (42 kDa) ein zusätzliches 32 kDa großes Protein in vergleichbarer Stärke exprimiert wurde. In der Western Blot-Analyse konnte mit einem N-I2PP2A-Antikörper, der gegen ein Epitop zwischen der Aminosäure 40 und 90 am N-Terminus von PhapII gerichtet ist, nur die 42 kDa-Proteinbande als PhapII identifiziert werden, obwohl mit dem anti-His-Antikörper beide Proteinbanden detektiert werden konnten (Abb. 22A und B). Bei der kleineren Proteinbande handelte es sich daher entweder um ein Degradationsprodukt von PhapII oder eine nicht korrekt gefaltete Form von PhapII, deren N-Terminus nicht durch den verwendeten Antikörper erkannt wurde.

Vergleichbares wurde von Beresford et al. (2001) für die PhapII-Expression in dem pET26b(+)-System beobachtet. Sie detektierten zwei C-terminal His₆-getaggte Proteinvarianten von PhapII, wobei die kürzere Proteinbande als eine anomal gefaltete Form des Proteins beschrieben wurde, da sie sowohl mit einem anti-His-Antikörper als auch mit einem anti-I2PP2A-Antikörper, der gegen ein Epitop am N-Terminus von PhapII (aa 3-16) gerichtet ist (Adachi et al., 1994), detektiert werden konnte. Mit dem letztgenannten Antikörper konnte in der vorliegenden Arbeit nur die 42 kDa-Bande nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu erreichen, dass das exprimierte Protein korrekt gefaltet wird, wurden verschiedene Expressionsstrategien verfolgt. Zunächst wurde die Expressionstemperatur von 37 °C auf 30 °C bzw. 21 °C erniedrigt. Bei niedrigen Temperaturen werden in *E. coli* eine Reihe von Chaperonen exprimiert, die Proteinen zu einer korrekten Faltung verhelfen, und gleichzeitig ist die Aktivität von Hitzeschock-Proteasen unter diesen Bedingungen vermindert, so dass das exprimierte Protein einer geringeren Proteolyse ausgesetzt ist (Sahdev et al., 2008). Die Expressionsleistung bei niedrigen Temperaturen ist im Allgemeinen verringert, so dass die Produktion von Proteinen in einer guten Ausbeute

auch eine längere Zeit in Anspruch nimmt. Dies könnte für die Expression von PhapII zusätzlich von Vorteil sein, da PhapII bei einer Induktionstemperatur von 37 °C in so großen Mengen synthetisiert wird, dass das Protein missgefaltet wird. Dieser Ansatz führte jedoch auch nicht zu einer Verringerung der Expression der kleineren Proteinvariante, so dass die Versuchsbedingungen hin zu einer Expression unter osmotischem Stress verändert wurden. Nach Barth et al. (2000) wirken organische Osmolyte wie Glycinbetain sowie durch Salzstress induzierte Chaperone stabilisierend auf das exprimierte Protein und verbessern dessen Faltung. Obgleich osmotischer Stress der Ausbildung der 32 kDa großen Proteinbande und weiterer Degradationsbanden zum Teil entgegenwirkte, konnte auch unter diesen Bedingungen die Expression der 32 kDa großen Proteinbande nicht vollständig verhindert werden (Abb. 25).

Um einen Einfluss des C-terminalen His₆-tags auf die Faltung des Proteins auszuschließen, wurde das pET22b-phapII-Konstrukt mit einem Stoppcodon vor dem His₆-tag generiert. Allerdings war auch bei der Expression dieses Konstrukts eine 42 und eine 32 kDa-Proteinbande nachweisbar. Eine Trennung der beiden Proteine war auch mit Hilfe der Poly-L-Lysin-Agarose-Chromatographie und der Gelfiltrationschromatographie an Sephacryl S 200 26/100 nicht vollständig. Die Beobachtung, dass die kleinere Proteinvariante trotz der vergleichsweise hohen Konzentration in der Zelle löslich ist und überdies keine *inclusion bodies* bildet, dass die Erniedrigung der Expressionstemperatur und die Induktion von Chaperonen durch osmotischen Stress keine Auswirkungen auf die Bildung des 32 kDa großen PhapII-Proteins hatten, deutet darauf hin, dass die 32 kDa-Form nicht durch eine Fehlfaltung entsteht.

Die endgültige Charakterisierung der 32 kDa-Bande gelang durch die massenspektrometrische Analyse der beiden Proteinformen von PhapII. Dabei konnten bei der kleineren Proteinvariante von PhapII N-terminale Peptide (11-44 aa) nicht identifiziert werden. Auch die exakte Bestimmung der Spaltstelle war nicht möglich; wahrscheinlich liegt sie zwischen den Aminosäureresten 44-63. Es gibt verschiedene Ursachen, die zur Spaltung eines rekombinanten Proteins führen können. Zum einen könnte die Verwendung eines alternativen Startcodons zu kleineren Proteinvarianten führen. Diese Möglichkeit wurde mittels Mutation eines möglichen zusätzlichen Startcodons im Expressionskonstrukt ausgeschlossen. Des Weiteren könnten bakterielle Proteasen, die den Proteinabbau am N-Terminus verursachen, verantwortlich sein. In bakteriellen Expressionssystemen sind insbesondere die Proteasen Lon und OmpT eine Ursache für den Proteinabbau. Daher wurden für die Proteinexpression der BL21(DE3)-Stamm und sein Abkömmling Rosetta

(DE3) pLysS verwendet, die in den Lon- und OmpT-Proteasen defizient sind (Gottesman, 1989; Sahdev et al., 2008). Eine Datenbanksuche nach möglichen weiteren bakteriellen Proteasen, die zwischen der Aminosäure 44-63 von PhapII spalten, ergab, dass solche Proteasen zumindest in der Datenbank nicht enthalten sind.

Nachdem die Expression unter der Kontrolle des T7-Promotors im pET22b(+)-System immer zur Bildung der beiden PhapII-Formen führte, die nicht für eine Kristallisation eingesetzt werden konnten, wurde die Expression unter der Kontrolle des Phagen T5-Promotors im pQE-30-System versucht. Dieser Promotor nutzt die *E. coli* eigene RNA-Polymerase, die zwar eine 5-fach niedrigere Aktivität aufweist als die T7-RNA-Polymerase des pET-Systems, jedoch kann damit die Proteinexpression langsamer ablaufen und das rekombinante Protein hätte mehr Zeit, um seine korrekte Faltung einzunehmen (Chamberlin und Ring, 1973; Golomb und Chamberlin, 1974; von Gabain und Bujard, 1977). Mit diesem System konnte ein N-terminal His₆-getaggtetes PhapII-Protein exprimiert werden, das in der SDS-PAGE bei 45 kDa wanderte, allerdings nur in sehr geringen Mengen exprimiert wurde. Dieses Expressionssystem wurde zusätzlich durch eine starke Basalexpression (Hintergrundexpression) von *E. coli*-Proteinen gestört. Die geringe Proteinexpression könnte auch an dem pQE-Vektor liegen, bei dem es sich um einen *low-copy* Plasmid handelt. Obgleich verschiedene *E. coli*-Stämme eingesetzt wurden, die u. a. das *lac*-Repressorprotein exprimieren und so den T5-Promotor stärker regulieren, konnte keine signifikante Verbesserung in der Expressionsleistung und Reinigung des PhapII-Proteins erreicht werden. Die geringe Expression im pQE-30-System kann nicht auf einer toxischen Wirkung des Proteins beruhen, die zum Absterben der Wirtszelle führt, da solch eine Wirkung während der Expression von PhapII in *E. coli* nicht beobachtet werden konnte. Die Untersuchungen zeigten, dass mittels des pQE-30-Systems grundsätzlich N-terminal His₆-getaggtetes PhapII in nur *einer* Proteinform exprimiert werden kann. Jedoch war das Expressionssystem wegen der geringen Ausbeute für die Herstellung von PhapII für die Kristallisation ungeeignet.

Da das pET-System aufgrund seiner starken T7-RNA-Polymerase-Aktivität hohe Proteinausbeuten ohne Hintergrundexpression bot, wurde das *phapII*-Gen in den pET45b(+)-Vektor kloniert, mit dem Ziel, N-terminal His₆-getaggtetes PhapII zu exprimieren. Tatsächlich konnte so PhapII in Volllänge mit einer guten Ausbeute exprimiert werden.

Offenbar führt die Expression von PhapII in einigen pET-Vektoren, wie z. B. pET22b(+) oder pET26(+), zur Spaltung bzw. anomalen Faltung des rekombinanten Proteins, deren

Ursache zurzeit noch unklar ist. Eine Gemeinsamkeit beider Vektor-Systeme ist, dass sie eine codierende Sequenz für einen C-terminalen His₆-tag besitzen. Der pET 28a(+)- und der pET45b(+)-Vektor, die beide rekombinante Proteine mit einem N-terminalen His₆-tag generieren, zeigten keine Spaltung bzw. Fehlfaltung des rekombinanten Proteins. Die Proteinausbeute mit dem pET45b(+)-Expressionssystem war gut; das PhapII-Protein zeigte allerdings mehrere Degradationsbanden, die auch unter Verwendung von Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltrationschromatographie mit verschiedenen Säulen unter wechselnden Pufferbedingungen nicht entfernt werden konnten. Auch der Einsatz von Proteaseinhibitoren zur Verhinderung des proteolytischen Abbaus, hohe NaCl-Konzentrationen (bis zu 500 mM) und/oder 10 % Glycerin zur Aufhebung von unspezifischen Interaktionen (Bornhorst und Falke, 2000) blieben erfolglos. Letztendlich konnte weder durch die Expression einer N-terminal His₆-getaggtten noch durch die einer C-terminal His₆-getaggtten Form des Proteins eine homogene Form von PhapII hergestellt werden, was eine Grundvoraussetzung für Kristallisationsversuche darstellt.

Daher wurde alternativ der Ansatz verfolgt, PhapII fusioniert mit einem GST-tag zu exprimieren. Ein großer Fusionsanteil wie GST-tag (~26 kDa) hat allerdings den Nachteil, dass er die Kristallisation des Proteins hemmen könnte und daher nach der Reinigung abgespalten werden muss. Außerdem führt ein großer Fusionsanteil in der Regel zu einer geringen Ausbeute des Zielproteins, da auch für die Produktion des Fusionsanteils zelluläre Ressourcen gebraucht werden. Für die Strategie, PhapII mit einem GST-tag zu exprimieren, sprach, dass Fusionsanteile wie GST-tag die Löslichkeit des exprimierten Proteins erhöhen, deren Faltung verbessern und vor proteolytischer Spaltung schützen können (Bowie und Sauer, 1989; Koken et al., 1993). Dieser Ansatz führte jedoch nicht zu der gewünschten Stabilisierung des exprimierten PhapII-Proteins; auch hier kam es schon während der Expression von GST-PhapII zur proteolytischen Spaltung des Proteins.

In weiteren Versuchen wurde das Verhalten des rekombinant exprimierten PhapII bei der Gelfiltrationschromatographie untersucht, mit dem Ziel, Hinweise auf die Größe, die Form und den Oligomerisierungsgrad des Proteins zu erhalten. Hierbei wurde PhapII mit His₆-tag und nach Abspaltung des His₆-tag bzw. des GST-tag untersucht. Durch den Vergleich mit Markerproteinen wurde ermittelt, dass die rekombinanten PhapII-Formen bei einer molaren Masse von 277 kDa von der Gelfiltrationschromatographie eluierten. Nach diesen Ergebnissen müsste PhapII in Form eines Oktamers vorliegen. Tatsächlich zeigen Untersuchungen von Muto et al. (2007) mittels Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse, dass das bakteriell exprimierte PhapII-Protein als Dimer vorliegt. Diese

Diskrepanz in der molaren Masse konnte schon in der SDS-PAGE beobachtet werden, da das PhapII-Protein in SDS-Polyacrylamidgelen stets höher läuft. Es gibt verschiedene Ursachen, die dieses Phänomen erklären könnten. Zum einen könnte die große Anzahl von sauren Aminosäureresten am C-Terminus von PhapII eine Ursache für ein abnormes Laufverhalten in SDS-Polyacrylamidgelen sein. Proteine wie Caldesmon oder Tropomyosin mit einer ähnlichen Zusammensetzung aus sauren Aminosäuren zeigen in SDS-Polyacrylamidgelen ebenfalls ein anomales Laufverhalten, das mit der hohen negativen Eigenladung dieser Proteine in Zusammenhang steht und nicht vollständig durch das SDS des Probenpuffers überdeckt werden kann (Qinwei und Jackowski, 2002). Andererseits könnten das veränderte Laufverhalten in der SDS-PAGE und die vorzeitige Elution des Proteins in der Gelfiltrationschromatographie auf eine veränderte Globularität des PhapII-Proteins hindeuten. So konnten Miyaji-Yamaguchi et al. (1999) für das PhapII-Protein einen Stokes-Radius von 52 Å statt der angenommenen 33 Å nachweisen, was auf eine gestreckte Form des Proteins hindeutet. Die Logarithmen der Stokes-Radien (R_s) für native Proteine können nach der Formel von Uversky (siehe 5.1) berechnet werden (Tcherkasskaya und Uversky, 2001; Uversky, 2002):

$$\log(R_s^N) = -(0,204 \pm 0,023) + (0,357 \pm 0,005) \cdot \log(M) \quad 5.1$$

Die nach der obigen Formel erhaltenen $\log(R_s)$ -Werte von Standardproteinen (siehe 3.5.13.3) wurden gegen ihre Elutionsvolumina während der Gelfiltrationschromatographie über Superdex 200 26/60 aufgetragen (Abb. 68). Mit Hilfe der so gewonnenen Regressionsgerade konnten für das PhapII-Volllängenprotein (VL), den Deletionsproteinen PhapII 1-257 und PhapII 1-247 sowie den PhapII-Proteinen mit einer Ser-9-Mutation (PhapII S9A, PhapII S9E) die jeweiligen Stokes-Radien berechnet werden (Tab. 14).

Im Falle eines globulären Proteins wie BSA, welches einen Stokes-Radius von 32,9 Å besitzt, der ähnlich ist wie der theoretisch hergeleitete Stokes-Radius von PhapII VL (32,5 Å), beträgt die molare Masse 66 kDa. Dagegen konnte für PhapII VL mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie ein Stokes-Radius von 54,4 Å ermittelt werden, der höher ist als der berechnete Stokes-Radius (32,5 Å) und einem Protein von 277 kDa zugeordnet werden kann (Tab. 14). Da PhapII VL als Dimer mit einer molaren Masse von 64,2 kDa vorliegt, resultiert der höhere Stokes-Radius möglicherweise aus der gestreckten Konformation des Proteins.

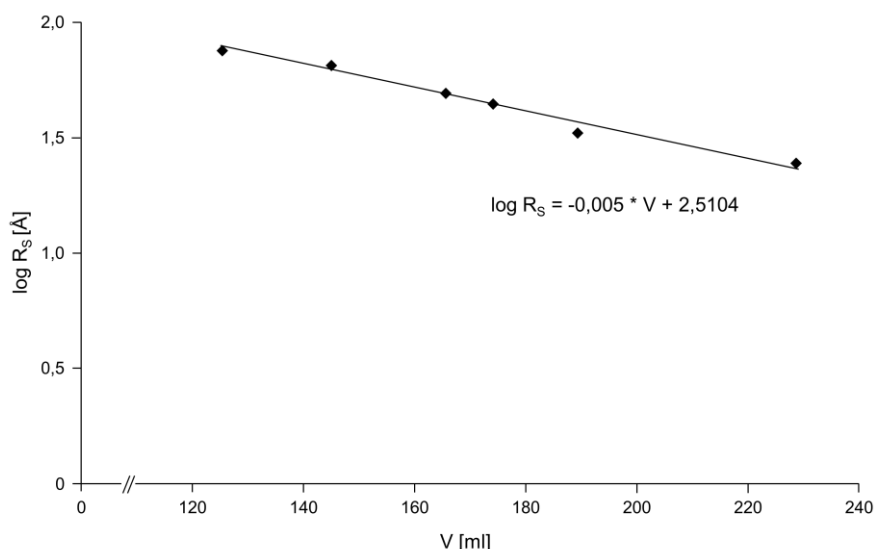


Abb. 68: Ermittlung der Stokes-Radien von verschiedenen Formen von PhapII-Proteinen.

Zunächst wurden die Logarithmen der Stokes-Radien von Standardproteinen mit Hilfe der Gleichung 5.1 ermittelt und diese anschließend gegen ihre Elutionsvolumina während der Gelfiltrationschromatographie über Superdex 200 26/60 aufgetragen. Die mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms ermittelte Formel der Regressionsgeraden diente zur Berechnung der Stokes-Radien der PhapII-Proteine.

Überdies können aus den Stokes-Radien Rückschlüsse über den Verlust der nicht-kovalenten Struktur gezogen werden (Tanford, 1968). Dies ist dann der Fall, wenn das Protein beispielsweise seine natürliche Faltung verliert, etwas, was ebenfalls zu einer Erhöhung des Stokes-Radius führt. Der Stokes-Radius für ein ungefaltetes Protein kann mit einer weiteren Formel von Uversky für globuläre Proteine nach Guanidiniumchlorid-Denaturierung berechnet werden (Uversky, 2002):

$$\log \left(R_s^{U(GdmCl)} \right) = -(0,723 \pm 0,033) + (0,543 \pm 0,007) \cdot \log (M) \quad (5.2)$$

Der berechnete R_s -Wert für ein ungefaltetes PhapII VL-Protein beträgt 77,2. Die gemessenen R_s -Werte aller PhapII-Proteine liegen zwischen den berechneten Stokes-Radien von einem gefalteten und einem ungefalteten Protein (Tab. 14), was darauf hindeuten würde, dass innerhalb der PhapII-Proteine zum Teil ungeordnete Bereiche existieren. Dies wäre auch mit den Ergebnissen der Kristallstrukturanalyse von PhapII 1-225 vereinbar, bei der die Aminosäurebereiche 17-19 und 168-188 aufgrund der ungeordneten Struktur nicht aufgelöst werden konnten (Muto et al., 2007). Der komplette saure C-terminale Bereich von Aminosäure 224-277 wurde bei den Kristallisationsexperimenten wahrscheinlich aus demselben Grund komplett ausgelassen.

Tab. 14: Stokes-Radien (R_s) und apparente molare Massen (M_R) von PhapII VL, den Deletionsproteinen PhapII 1-257 und PhapII 1-247 sowie den Ser-9-Mutanten PhapII S9A und PhapII S9E ermittelt aus den Elutionsvolumina während der Gelfiltrationschromatographie über Superdex 200 26/60. Die Beschriftung P1 und P2 stehen für Peak 1 und Peak 2 der Gelfiltrationsschromatographie.

Protein	M_R [berechnet]	R_s [gefaltet] ⁺	R_s [ungefaltet] ⁺⁺	M_R [gemessen]	R_s [Gelfiltration]	Oligomerisierungs- zustand
PhapII VL	64,2	32,5	77,2	277	54,4	Dimer
PhapII 1-257	59,8	31,7	74,3	213	49,6	Dimer
PhapII 1-247	57,6	31,3	72,8	186,4	37,9	Dimer
PhapII S9A P1	64,2	32,5	77,2	316	56,8	Dimer
PhapII S9A P2	64,2	32,5	77,2	182	46,9	Dimer
PhapII S9E P1	64,2	32,5	77,2	275	54,4	Dimer
PhapII S9E P2	64,2	32,5	77,2	174	46,2	Dimer
+) nach Formel 5.1; ++) nach Formel 5.2						

Mit der Deletion des C-terminalen Bereiches nähert sich der experimentell ermittelte Stokes-Radius denen von vergleichbaren globulären Proteinen (siehe Tab. 14), da weniger unstrukturierte Bereiche in dem Protein, die zu einer Erhöhung des Stokes-Radius führen, vorliegen. Das Deletionsprotein PhapII 1-247 besitzt beispielsweise bei einer molaren Masse von 57,6 kDa (Dimer) einen gemessenen Stokes-Radius von 37,9 Å, der dem berechneten Wert von 31,3 Å für ein vollständig gefaltetes Protein sehr nahe kommt. Interessant ist das Verhalten der Ser-9-Mutanten. Hier konnten mittels der Gelfiltrationschromatographie im Vergleich zu dem nicht mutierten Volllängenprotein und den Deletionsproteinen von PhapII zwei Elutionsmaxima beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), wobei jeweils der zweite Peak Proteinen mit einem kleineren Stokes-Radius zugeordnet werden konnte (Tab. 14). So zeigen beide Ser-9-Mutationen einen Einfluss auf die Konformation des Proteins trotz des vollständig unstrukturierten C-Terminus, der den größten Anteil an der Erhöhung des Stokes-Radius einnimmt. Die Imitierung einer strukturellen Phosphorylierung scheint dabei keine Rolle zu spielen, sondern nur die Mutation an Ser-9 selbst, die in der Nähe der Dimerisierungsdomäne liegt. Insgesamt scheinen die analysierten PhapII-Proteine unstrukturierte Bereiche zu besitzen, d. h. eine intrinsische Unordnung in ihrer Sekundärstruktur aufzuweisen, die zu einer gestreckten Form der Proteine führt.

Die Ursache für diese intrinsische Unordnung ist in der Aminosäurezusammensetzung von PhapII zu suchen. Eine große Anzahl von nicht kompensierten Ladungsgruppen, die sich in extremen pI-Bereichen bemerkbar machen, der geringe Gehalt an hydrophoben Aminosäureresten und die niedrige Sequenzkomplexität sind Voraussetzungen für das

Fehlen einer kompakten Proteinstruktur (Uversky, 2002). In der Tat besteht das PhapII-Protein an seinen letzten 54 Aminosäureresten fast ausschließlich aus Aspartat- und Glutamatresten (~ 80 %) und nur drei hydrophoben Aminosäureresten, die dann zu einem pI-Wert des Proteins von 4,1 führen. Intrinsisch ungeordnete Proteine lassen sich neben der Bestimmung des Stokes-Radius mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie auch über die Röntgenstrukturanalyse, NMR-Spektroskopie, Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie und Proteinverdau charakterisieren (Dunker et al., 2001). In der Röntgenstrukturanalyse führen ungeordnete Bereiche zu einer fehlenden Elektronendichte in der Proteinstruktur (Dunker et al., 2001). Diese liegen bei PhapII im Aminosäurenbereich 17-19, 168-188 und 224-277, wobei der letzte Bereich gemäß den CD- und Röntgenstrukturdaten von NAP-1 aus Hefe postuliert wird, keine geordnete Struktur anzunehmen (McBryant et al., 2003; Muto et al., 2007; Park und Luger, 2006). Bei PhapII, das auch bekannt ist unter den Synonymen SET/TAF-1 β , I2PP2A und INHAT, handelt es sich um ein Histonchaperon der NAP-1-Familie. Insbesondere die *earmuff domains* von PhapII und NAP-1 aus Hefe sind hoch konserviert und deuten auf eine evolutionäre Verwandtschaft hin (Muto et al., 2007). Die Elektronendichte zwischen β 4-Faltblatt und α 6-Helix (aa 168-188) konnte nicht aufgelöst werden, da dieser Bereich in wässrigen Lösungen wahrscheinlich hoch mobil ist (Muto et al., 2007). Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass die Peptidbindung zwischen den Aminosäureresten K176 und A177, die in dieser mobilen Region lokalisiert sind, durch die Protease Granzym A von cytotoxischen T-Lymphozyten gespalten wird (Beresford et al., 2001). Diese hohe Flexibilität ist typisch für intrinsisch ungeordnete Proteine und führt dazu, dass die Proteine empfindlich gegenüber Proteasen sind (Uversky, 2002). So konnten Fontana et al. (1997) zeigen, dass die Proteolyserate ansteigt, wenn die F-Helix des Myoglobin in einen ungeordneten Zustand gebracht wird. Tatsächlich konnten für PhapII mit Hilfe des ExPASy PeptideCutter Tools eine Reihe von Proteasen (Asp-N Endopeptidase, Chymotrypsin, Glutamyldopeptidase, Pepsin, Proteinase K, Staphylococcus-Peptidase I, Thermolysin) gefunden werden, die präferenziell im C-terminal sauren Bereich schneiden könnten. Allerdings war in dieser Arbeit der C-terminale Bereich von PhapII unempfindlich gegenüber der Protease Trypsin. Aufgrund dieser Trypsin-Resistenz war es nicht möglich, ein MS-Spektrum dieses Bereiches aufzunehmen.

Zusätzliche Proteinbanden, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, könnten allerdings nicht nur durch proteolytischen Verdau entstehen, sondern auch Folge einer sogenannten ribosomalen Pause sein. Zwei mögliche Ursachen für eine ribosomale

Pause sind mRNA-Sekundärstrukturen und nicht ausreichende Mengen von Aminosäure beladener tRNA (Reznikoff und Gold, 1986). Das letztere kann Ergebnis eines selten vorkommenden Codons, unzureichender Mengen von spezifischen Aminosäuren oder schneller Erschöpfung von Aminosäure beladenen tRNAs sein (Bula und Wilcox, 1996). In den Expressionsversuchen wurde meist der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS eingesetzt, der zusätzliche sechs tRNAs für die Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Leucin, Prolin und Glycin enthält, die in *E. coli* selten benutzt werden, um eine optimale Expression eukaryotischer Proteine zu ermöglichen. Überdies ist der Anteil der genannten Aminosäuren in PhapII geringer als in typischen *E. coli*-Proteinen (Kane, 1995), so dass dies kein Problem bei der Translation darstellen sollte. Im Vergleich dazu machen die Aminosäuren Aspartat und Glutamat 12,3 % bzw. 19,5 % des PhapII-Proteins aus, die somit den doppelten bzw. dreifachen Anteil haben als in typischen *E. coli*-Proteinen. Obgleich die Codone für Glutamat und Aspartat in *E. coli* nicht zu denen gehören, die selten vorkommen, wäre eine Erschöpfung der mit Aspartat und Glutamat beladenen tRNAs denkbar. Außerdem ist die Expressionsrate von PhapII, insbesondere im pET-Expressionssystem, sehr hoch, so dass es möglich wäre, dass die Glutamyl- und die Aspartyl-tRNAs schnell erschöpfen (*hungry codons*) und die Ribosomen an dem 5'-Teil der mRNA akkumulieren (Lindsley und Gallant, 1993; Sipley und Goldman, 1993). Insbesondere die Expression von Genen mit Bereichen, die für eine Abfolge gleicher Aminosäuren codieren, könnte sich besonders schwierig erweisen. Ein Extrembeispiel stellt das Pseudorabies-Virus IE180-Protein dar, das 17 Serinreste in einem Bereich von 18 Aminosäureresten aufweist, wodurch die Expression in *E. coli* ineffektiv ist (Bula und Wilcox, 1996). So erscheint es auch möglich, dass es während der Translation des sauren C-Terminus von PhapII, der zu fast 80 % aus Glutamat- und Aspartatresten besteht, zu einem vorzeitigen Abbruch kommt.

Eine weitere mögliche Ursache für die beobachtete Expression von zwei Formen von PhapII ist die unterschiedliche posttranslationale Modifikation von eukaryotischen Proteinen in prokaryotischen Expressionssystemen. Dabei spielen bei PhapII Disulfidbrückenbindungen, die in eukaryotischen Systemen ausgebildet werden und so das Protein in seiner Sekundärstruktur stabilisieren, keine Rolle, da PhapII keine Cysteinreste besitzt. In verschiedenen humanen Zelllinien wurde eine *in vivo* Phosphorylierung von PhapII an Serinresten nachgewiesen (Adachi et al., 1994). Ser-9-Mutationen, die eine strukturelle Phosphorylierung (S9E) bzw. eine nicht phosphorylierbare (S9A) Form von PhapII imitierten, zeigten hingegen keinen Einfluss

auf die Expression und Stabilität des Proteins. Interessanterweise konnte eine mögliche N-Glykosylierungsstelle an Asn-146 von PhapII identifiziert werden (NetNGlyc 1.0). Über eine Glykosylierung von PhapII ist allerdings nichts bekannt. Die Expression von PhapII in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 führte zu einer sehr geringen Ausbeute und es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein einer Proteolyse unterworfen ist.

Die Probleme mit den verschiedenen Expressions- und Reinigungssystemen sind möglicherweise damit zu erklären, dass es sich bei PhapII um ein in Teilen intrinsisch ungefaltetes Protein handelt. Es zeigt die typischen Charakteristika eines solchen Proteins (s. o.). Ungeordnete Bereiche in Proteinen haben den Vorteil, dass sie unterschiedliche Liganden binden können, wobei die Bindungsstellen durch tertiären Kontakt anstatt durch die Primärsequenz des Proteins entsteht (Esteve et al., 2003). So nimmt beispielsweise das Cyclin abhängige Kinaseinhibitorprotein p21^{Cip1} eine gestreckte Konformation ein, wenn es an PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) und PhapII bindet, aber eine α -Helix-Struktur, nach Bindung an Calmodulin (CaM) (Esteve et al., 2003). Intrinsisch ungeordnete Proteine können während der Bindung an einen Interaktionspartner in einen geordneten Zustand übergehen und widerlegen damit die allgemeine Ansicht, dass stabile Sekundär- und Tertiärstrukturen Voraussetzungen sind für eine vollständige Funktion von Proteinen (Prosinecki et al., 2007). Der Vorteil des Übergangs von einem ungeordneten in einen geordneten Zustand während der Ligandenbindung ist, dass dadurch Energie freigesetzt wird, die für die hohe Spezifität der Bindung verantwortlich ist (Dunker et al., 2001). Aufgrund ihrer Vielseitigkeit sind intrinsisch ungeordnete Proteine in vielen kritischen Signaltransduktions- und Regulationswegen involviert, deren Ausfall dramatische Auswirkungen auf die Zellfunktion haben können (Prosinecki et al., 2007; Tompa, 2002; Wright und Dyson, 1999). Ein gutes Beispiel ist p21^{Cip1}, ein Protein, das als Inhibitor in einer Reihe von Cyclin-Cdk-Komplexen fungiert, die an der Regulation des G1/S-Checkpoints verantwortlich sind (Harper et al., 1995). Bei PhapII, ebenfalls involviert in Signalgebungsvorgängen, ist denkbar, dass der ungeordnete C-Terminus durch die Bindung an seinen Interaktionspartner in eine geordnete Konformation übergeht. Verschiedene Bindungspartner, die mit dem sauren C-Terminus von PhapII interagieren, sind bereits beschrieben und weisen auf die vielseitige Funktion des PhapII-Proteins bei unterschiedlichen zellulären Vorgängen hin. PhapII bindet beispielsweise an verschiedene Proteine, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind wie p21^{Cip1}, Cyclin E-CDK, B-Cycline und p35^{nck5a} (Estanyol et al., 1999; Kellogg et al., 1995; Qu et al., 2002).

Darüber hinaus interagiert PhapII mit nukleosomalen Histonen und inhibiert so unter anderem die Histon-Acetylierung, indem es als Komponente des INHAT-Komplexes die C-terminalen Enden der Histone verdeckt (Kutney et al., 2004; Matsumoto et al., 1999; Schneider et al., 2004; Seo et al., 2001). Für das NAP-1-Protein der Hefe konnte eine stabilisierende Funktion des sauren C-Terminus während der Histonbindung nachgewiesen werden, was auf einen ähnlichen Einfluss für PhapII hinweist (Park und Luger, 2006).

Als ein weiterer Interaktionspartner von PhapII konnte in unserer Arbeitsgruppe L-Selektin identifiziert werden (Kilian, 2002). Über seine direkte Interaktion mit der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin könnte PhapII eine wesentliche Regulatorfunktion in der L-Selektin-vermittelten Signalgebung zukommen. Es ist jedoch noch unklar, wie PhapII zwischen diesen verschiedenen zellulären Funktionen umschaltet. Die strukturelle Anpassung des intrinsisch ungeordneten C-Terminus wäre *eine* Erklärung dieses Phänomens.

Im Zeitraum der Entstehung der vorliegenden Arbeit wurde die Kristallstruktur von PhapII zum Teil aufgeklärt (Muto et al., 2007). Jedoch wurde der komplette saure C-Terminus nicht dargestellt, ebenso steht eine Kristallisation im Komplex mit LScyto noch aus. Ziel der Co-Kristallisationsversuche der vorliegenden Arbeit war es, die Konformation der Bindungspartner zu charakterisieren, da beide Proteine unstrukturierte Bindungsbereiche besitzen.

Das PhapII-Protein ist während der Expression aufgrund seines ungeordneten C-terminalen Bereiches möglicherweise Substrat von Proteasen und neigt zu Degradation. Auch wenn es zu einer Kristallbildung käme, wäre es nicht sicher, dass es sich dabei um das Volllängeprotein von PhapII handelte. Darüber hinaus ist bekannt, dass Proteine mit einer intrinsischen Unordnung in ihrer Sekundärstruktur während der Röntgendiffraktion keine Elektronendichte zeigen. Daher war eine weitere Idee, die Probleme, die durch das Auftreten von zwei und mehr Formen von PhapII bei der Expression entstanden, zu überwinden, indem PhapII simultan mit LScyto exprimiert wird, um dadurch den intrinsisch ungeordneten Bereich zu stabilisieren und vor der Proteolyse zu schützen. Die Co-Reinigung erwies sich als schwierig, zum Teil durch die geringe Ausbeute von GST-LScyto, aber auch durch die mangelnde Bindung des His-PhapII-GST-LScyto-Komplexes an die Ni^{2+} -NTA-Affinitätssäule. Möglicherweise wurde der His₆-tag durch den großen Proteinkomplex behindert oder His₆-PhapII erfuhr durch die Bindung eine Konformationsänderung und verdeckte so den Affinitäts-tag. Für diese Annahme spricht,

dass durch eine denaturierende Reinigung eine Bindung von His₆-PhapII an die Ni²⁺-NTA-Agarosesäule nachgewiesen werden konnte (Abb. 49).

Das GST-LScyto-Protein alleine ließ sich in dem pGEX-System in ausreichenden Mengen exprimieren, so dass es eine weitere Möglichkeit der PhapII-Reinigung bot. Über eine GSH/GST-LScyto-Säule konnte zwar PhapII gebunden, aber eine vollständige Entfernung der Degradationsprodukte dennoch nicht erreicht werden (Abb. 51). Trotz der angenommenen proteolytischen Spaltung war die Bindungsfähigkeit und die inhibitorische Aktivität von PhapII nachweisbar, gleichgültig mit welchem Expressionssystem das PhapII-Protein generiert wurde. Die initialen Kristallisationsscreens des PhapII-LScyto-Komplexes, die durchgeführt wurden, ergaben jedoch keine Proteinkristalle. Die hierfür verantwortlichen Ursachen liegen vermutlich in der Anwesenheit von Degradationsprodukten.

5.3 Cytokinausschüttung nach L-Selektin-Stimulation

5.3.1 Cytokinfreisetzung in Granulozyten

Die Granulozyten, die aufgrund ihrer verschiedenen Nukleusformen auch polymorphnukleäre Leukozyten genannt werden, bilden mit 55-80 % den größten Anteil innerhalb der Gruppe der Leukozyten. Sie gehören zu den ersten Zellen, die in entzündete Gewebe einwandern und dort eingedrungene Erreger zerstören (Cassatella, 1998). Dieser Prozess wird durch die Cytokine TNF- α und IL-8, die als Antwort auf Pathogene von den Gewebsmakrophagen sezerniert werden, aktiviert. Auf der einen Seite führt in neutrophilen Granulozyten Crosslinking des Adhäsionsrezeptors L-Selektin zu einer verstärkten IL-8-Expression (Simon et al., 1995), auf der anderen Seite kommt es durch IL-8 auch zu einer proteolytischen Abspaltung von L-Selektin von der Zelloberfläche (Taub, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnten in initialen Experimenten Hinweise gefunden werden, dass nach L-Selektin-Ligation mit den Antikörpern DREG 200 und DREG 55 das Cytokin IL-8 verstärkt exprimiert bzw. sezerniert wird. Diese ersten Versuche zeigen auch, dass nach Costimulation mit IL-8 und DREG 55/DREG 200 die Expression von IL-8 ebenfalls erhöht ist (Abb. 56). Für Neutrophile konnte gezeigt werden, dass L-Selektin-Ligation in Kombination mit einer gleichzeitigen IL-8-Stimulation zu einer verstärkten Degranulation führt (Smolen et al., 2000). Dies könnte auch auf weitere Effekte wie Cytokinausschüttung hinweisen. Eine Wechselwirkung zwischen L-Selektin und dem Chemokinrezeptor IL-8

ist bereits seit längerem bekannt (Haribabu et al., 1997). In der hier vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal Hinweise auf eine Freisetzung von Cytokinen nach IL-8-Stimulation in Granulozyten beschrieben werden. Es bedarf jedoch weiterführender Untersuchungen, um den Zusammenhang zwischen L-Selektin und IL-8-Rezeptor im Detail zu verstehen.

Bereits seit einiger Zeit wird die Frage nach der Fähigkeit von Granulozyten, proinflammatorische Cytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α zu sezernieren, kontrovers diskutiert. Dies ist vor allem an den technischen Schwierigkeiten der Experimente begründet. Generell ist der Umgang mit Granulozyten und deren Isolierung schwierig, da hier bereits kleinste Kontaminationen mit Monozyten oder eine Voraktivierung der Zellen die Ergebnisse signifikant beeinflussen können. Molekularbiologische Untersuchungen der letzten Jahre konnten zeigen, dass Neutrophile in der Tat IL-1 β -mRNA produzieren können (Altstaedt et al., 1996; Witko-Sarsat et al., 2000). Die initialen Versuche der vorliegenden Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, da nach Costimulation von Granulozyten mit DREG 55/200 und IL-8 die Konzentration an IL-1 β in Zellüberständen erhöht war.

5.3.2 Cytokinfreisetzung in T-Zellen

T-Zell-Aktivierung führt zur Zellteilung und Cytokinexpression und wird in der Regel durch zwei unabhängige Signale induziert: Das erste Signal stellt dabei die antigen-abhängige Stimulation der Zellen über den CD3/TCR-Komplex dar. An dem zweiten, antigen-unabhängigen Signal (Costimulus) können verschiedene Moleküle beteiligt sein, wie z. B. Cytokine (IL-1, IL-6, IL-12) oder auch Antikörper gegen unterschiedliche Zelloberflächenmoleküle wie das Integrin LFA-1 (Cerdan et al., 1995; Chambers und Allison, 1999; Janeway et al., 2002; Watts und DeBenedette, 1999). Das am besten charakterisierte Beispiel hierfür stellt die Interaktion des CD28-Rezeptors auf den T-Zellen mit seinen Liganden CD80 und CD86 dar, die auf dendritischen Zellen, aktivierten Monozyten, B-Zellen und wiederholt aktivierten T-Zellen exprimiert werden (Kubin et al., 1994). Eine CD28-Costimulation in Verbindung mit einer CD2- oder CD3-medierten T-Zellaktivierung bewirkt, dass die T-Zelle in die G₁-Phase des Zellzyklus eintritt und gleichzeitig die Synthese von IL-2 sowie der α -Kette des IL-2-Rezeptors induziert wird (Janeway et al., 2002; Kubin et al., 1994). Bei Fehlen dieses costimulierenden Signals geht die T-Zelle in einen funktionell inaktivierten Zustand über, der auch als klonale Anergie bezeichnet wird. Charakteristisch für die klonale Anergie ist

auch das Ausbleiben der IL-2-Produktion (Linsley und Ledbetter, 1993). Die Signalgebung durch CD28 wirkt stabilisierend auf die IL-2-mRNA und führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (*activator protein 1*) und NF- κ B, wodurch die IL-2-Synthese zum Teil um das 100-fache gesteigert werden kann (Janeway et al., 2002).

Auch L-Selektin wird eine costimulatorische Aktivität zugesprochen. So zeigten humane periphere Blutlymphozyten nach einer Stimulation mit anti-CD3- und L-Selektin-Antikörpern eine erhöhte Zellproliferation, die möglicherweise auf eine Interaktion von L-Selektin mit Komponenten des TCR-Komplexes zurückzuführen ist (Murakawa et al., 1992). Eine erhöhte T-Zellteilung konnte auch mit dem murinen anti-L-Selektin-Antikörper MEL-14 (Gallatin et al., 1983) als Costimulus erreicht werden, wobei eine IL-2-Expression ausblieb (Nishijima et al., 2005).

In den hier vorgestellten orientierenden Experimenten konnte nach Stimulation von humanen T-Lymphozyten aus dem Blut mit anti-CD3-Antikörper und den L-Selektin-Antikörpern DREG 55 und DREG 200 eine 72-fache Erhöhung der IL-2-Sekretion gezeigt werden (Abb. 57). Anti-CD3-Antikörper oder die DREG-Antikörper alleine führten zu keiner signifikanten Sekretion von IL-2. Die anti-L-Selektin-Antikörper der DREG-Serie und MEL-14 erkennen beide die Lektin-Domäne, wobei sie sich in der Bindung der Epitope unterscheiden. Untersuchungen von Green et al. (2003) zeigten, dass eine bivalente Bindung von L-Selektin durch die Antikörper DREG 55 und DREG 200 zu einer Verstärkung intrazellulärer Signalgebungsereignisse führen kann.

Weiterhin zeigten sich erste Hinweise auf, dass DREG-Antikörper als costimulatorisches Signal zu einer Erhöhung der IL-10-Sekretion in T-Lymphozyten führen können. IL-10 wird von verschiedenen T-Zell-Subgruppen wie T-Helfer-Typ-2-Zellen (Th2), regulatorischen T-Zellen (Tr1, Th1, Th17) sowie von CD8-positiven T-Zellen sezerniert (O'Garra und Vieira, 2007). Von zentraler Bedeutung ist IL-10 vor allem durch seine Inhibition der T-Zellaktivierung, IL-10 wirkt daher im allgemeinen anti-inflammatorisch. Diese Wirkung wird u.a. durch eine Hemmung der Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 erreicht. Darüber hinaus wirkt IL-10 der Produktion von Cytokinen wie IL-2, IFN- γ , IL-4 und IL-5 und somit den Effekten von APCs, aber auch den Effekten von proinflammatorischen Cytokinen wie IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- α , sezerniert von Makrophagen und dendritischen Zellen, entgegen (Mosser und Zhang, 2008).

5.4 Identifizierung neuer LScyto-Interaktionspartner

In früheren Arbeiten wurden bereits eine Reihe von Interaktionspartnern der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin identifiziert (Mitglieder der PKC-Familie, Calmodulin, Ezrin, Moesin, p56^{lck}, PhapII), die an verschiedenen Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sind (Ivetic et al., 2002; Kahn et al., 1998; Kilian et al., 2004; Pavalko et al., 1995; Xu et al., 2008). Während Signaltransduktionsprozesse, die über die Phosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrests von LScyto ablaufen, vergleichsweise gut beschrieben sind (Brenner et al., 1997; Waddell et al., 1995), sind die Prozesse und die Regulierung der Phosphorylierung der beiden Serinreste von LScyto noch unzureichend untersucht. Ziel des hier angewandten Yeast-Two-Hybrid-Systems war, weitere cytoplasmatische Interaktionspartner zu finden, die insbesondere in der Regulation der Phosphorylierung von LScyto eine Rolle spielen.

Bei dem Yeast-Two-Hybrid-System handelt es sich um eine *in vivo* Detektionsmethode von Protein-Protein-Interaktionen, die im Vergleich zu *in vitro* Methoden wie der Co-Immunoprecipitation deutlich sensitiver ist (Allen et al., 1995). Der größte Vorteil dieser Methode ist allerdings, dass eine große Anzahl von möglichen interagierenden Proteinen detektiert werden kann ohne aufwendige Optimierungsarbeit für jeden einzelnen Proteinkomplex (Phizicky und Fields, 1995). Daher konnten mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems eine Vielzahl neuer Wechselwirkungen beschrieben und so verschiedene biologische Signalwege im Detail aufgeklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein GAL4-basierter Yeast-Two-Hybrid-Screen mit LScyto als Köder (*Bait*) und einer Leukozyten-cDNA-Bibliothek durchgeführt. Da die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin aus nur 17 Aminosäuren besteht, wurde sie in triplikatier Form hintereinander in den Baitvektor pGBKT7 kloniert und als 3xLScyto bezeichnet. So konnte die Wahrscheinlichkeit einer möglichen sterischen Blockierung durch den deutlich größeren GAL4-BD-Fusionsteil vermindert werden. Im Anschluss an die Klonierung wurde die Expression von 3xLScyto im *S. cerevisiae*-Stamm AH109 bestätigt. AH109 besitzt vier Reportergene (*HIS3*, *ADE2*, *lacZ*, *MEL1*), die unter der Kontrolle von verschiedenen Promotoren stehen, was das Auftreten falsch positiver Klone vermindert. Viele falsch positive Klone entstehen im Yeast-Two-Hybrid-System auch aufgrund einer spezifischen Interaktion mit Sequenzen innerhalb der Promotorregion (James, 2001). Das verwendete *Bait*-Plasmid zeigte sich für den Yeast-Two-Hybrid-Screen als geeignet, da es zu keiner *HIS3*-Basalexpression führte bzw. auch nicht toxisch für die AH109-Zellen war.

Da der Erfolg eines solchen Screens auch maßgeblich von der Qualität der cDNA-Bibliothek abhängt, wurde die cDNA aus frisch isolierten Leukozyten generiert und mittels Gelelektrophorese auf Degradationsprodukte hin untersucht (Abb. 63B). In drei durchgeführten Screens wuchsen insgesamt 5 Klone, die weiteren Selektionen unterzogen wurden, um restliche mögliche falsch positive Klone zu entfernen. Bis auf einen Klon wuchsen alle Klone bis zur höchsten Selektionsstringenz, ein Hinweis, dass es sich um starke Interaktionspartner handelt. Schließlich konnte im Rahmen dieses Screens FBLP-1 (*Filamin-binding LIM protein 1*) als möglicher Bindungspartner von LScyto identifiziert werden. Dabei wurde das FBLP-1-Protein hier zum ersten Mal als in Leukozyten exprimiert nachgewiesen. FBLP-1 wurde ursprünglich ebenfalls in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen einer humanen Plazenta-cDNA-Bank mit Filamin B als Köder (*Bait*) als eine Spleißvariante von Migfilin gefunden (Takafuta et al., 2003). FBLP-1 besteht aus einer N-terminalen Region ohne auffällige Sequenzmotive, einer zentralen Prolin-reichen Region, zwei LIM-Domänen und statt der dritten LIM-Domäne wie bei Migfilin aus einer 76 aa langen, nicht weiter spezifizierten Sequenz (Takafuta et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnten ein Fragment von FBLP-1 gefischt und die letzten C-terminalen 34 Aminosäurereste (341-374 aa) des Proteins sequenziert werden. Bisher konnte kein Interaktionspartner gefunden werden, der an diesen 76 aa langen Abschnitt mit keinerlei Homologie zu anderen Proteinen, bindet. Aufgrund der fehlenden dritten LIM-Domäne kann FBLP-1 wahrscheinlich nicht an Kindlin-2/Mig-2 binden, ein Cytoskelettprotein, das Migfilin an Orte der Zell-ECM (*extracellular matrix*)-Adhäsion rekrutiert (Takafuta et al., 2003; Tu et al., 2003). So könnte FBLP-1 in anderen bisher noch nicht bekannten zellulären Prozessen von Bedeutung sein. FBLP-1 kann vergleichbar zu Migfilin über seine Prolin-reiche Domäne auch an VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*), ein Aktinbindeprotein, das an Orten der Zelladhäsion und in Lamellipodia nachgewiesen wurde, binden (Krause et al., 2003; Tu et al., 2003). In umfangreichen Arbeiten konnte FBLP-1 in verschiedenen humanen Geweben nachgewiesen werden wie z.B. Gehirn, Herzen, Niere, Lunge, Pankreas, Plazenta, Skelettmuskeln, Plättchen sowie der Megakaryozyten ähnlichen Zelllinie CMK (Takafuta et al., 2003). Insbesondere in den Stressfibrillen der Zellen scheint FBLP-1 vorhanden zu sein, was auf eine Rolle in der dynamischen Reorganisation der Stressfibrillen und weiterer Bereiche des Cytoskeletts hindeutet (Takafuta et al., 2003).

Ein weiterer interessanter Interaktionspartner von Migfilin ist Src, ein Mitglied der Src-Familie der Nicht-Rezeptorproteintyrosinkinasen (Korade-Mirnic und Corey, 2000). Src

besteht ähnlich wie andere Mitglieder dieser Familie aus sechs funktionellen Domänen: der N-terminalen Src-Homologie-Domäne 4 (SH4), einer *unique* Domäne, einer SH3-Domäne, einer SH2-Domäne, einer katalytischen Domäne (SH1) und einer C-terminalen regulatorischen Domäne (Tatosyan und Mizenina, 2000). Die Kinasen der Src-Familie liegen in einer inaktiven geschlossenen Konformation vor, die nach Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrests ihrer regulatorischen Domäne oder nach Bindung an ihr Substrat in eine offene Konformation übergeht (Xu et al., 1999). Anschließend können die Src-Kinasen an einem anderen Tyrosinrest im Aktivierungsloop der Kinase-Domäne phosphoryliert und aktiviert werden (Sicheri und Kuriyan, 1997; Yamaguchi und Hendrickson, 1996).

p56^{lck}, ein weiteres bekanntes Mitglied der Src-Familie, wird, wie bereits erwähnt, in Jurkat T-Zellen nach Stimulation mit monoklonalen anti-L-Selektin-Antikörpern oder Sulfatiden Tyrosin-phosphoryliert und dadurch aktiviert (Brenner et al., 1996; Xu et al., 2008). Anschließend phosphoryliert p56^{lck}, welches über seine SH2-Domäne konstitutiv an die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin gebunden vorliegt, L-Selektin am C-terminalen Tyrosinrest und dissoziiert dann von L-Selektin ab. Die Prolin-reiche Domäne von Migfilin kann mit der SH3- und der SH2-Domäne von Src interagieren (Zhao et al., 2009), so dass auch eine Bindung von FBLP-1 an p56^{lck} aufgrund der homologen Domänen möglich erscheint. FBLP-1 könnte hierdurch auch in räumlicher Nähe zur cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin kommen, so dass eine Interaktion der beiden Proteine stattfinden könnte.

Die Aktivierung von p56^{lck} führt zu einer Reihe von intrazellulären Tyrosinphosphorylierungsereignissen und zur Aktivierung verschiedener Proteine (siehe 1.4.3). Dabei kommt es u.a. auch zur Freisetzung von Ca²⁺-Ionen, die den nukleären Transport von FBLP-1 regeln könnten. FBLP-1 wird zum Teil auch im Nukleus detektiert und diese nukleäre Lokalisation wird zum einen über die intrazelluläre Calciumausschüttung reguliert und zum anderen über eine nukleäre Exportsequenz (NES), die sich innerhalb der Prolin-reichen Domäne befindet (Akazawa et al., 2004; Takafuta et al., 2003). So könnte FPLP-1 Signale aus dem Cytoplasma in den Kern vermitteln und wäre eine mögliche Erklärung, wie L-Selektin nach Stimulation die Genexpression induziert. In weiterführenden Arbeiten soll dieses Protein als möglicher Interaktionspartner von LScyto weiter untersucht und charakterisiert werden.

Die geringe Anzahl von Interaktionspartnern der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin, die mit Yeast-Two-Hybrid-Screens identifiziert wurden, könnte darauf

hindeuten, dass die Interaktion von LScyto mit seinen Bindungspartnern schwach ist oder einen weiteren Bindungspartner benötigt, was mit diesem Detektionssystem nicht ausreichend gut nachgewiesen werden könnte (Bartel et al., 1996). Eine Alternative zum Yeast-Two-Hybrid-System könnte daher das Protein-Drei-Hybrid-System darstellen, das den Nachweis von Interaktionen von Proteinkomplexen ermöglicht. Zhang und Lautar (1996) konnten mit diesem System die Grb2-vermittelte Interaktion der cytoplasmatischen Domäne des EGF-Rezeptors mit dem Sos-Protein nachweisen. So wäre es für die cytoplasmatische Domäne von L-Selektin auch möglich, dass es eines dritten Bindungspartners bedarf.

Eine weitere Alternative für die Detektion neuer Interaktionspartner der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin könnte das Split-Ubiquitin Yeast-Two-Hybrid-System bieten, mit der Membranprotein-Interaktionen nachgewiesen werden können (Johnsson und Varshavsky, 1994). Die Methode nutzt die spontane Reassemblierung des nativen Ubiquitins, das in einen N-terminalen (Nub) und in einen C-terminalen Teil (Cub) aufgespalten werden kann (Johnsson und Varshavsky, 1994). Ubiquitin ist ein kleines (8,5 kDa), hoch-konserviertes Protein, das an Lysinreste von anderen Proteine angehängt wird, die für den proteosomalen Abbau bestimmt sind (Hershko und Ciechanover, 1992). Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass für die Bildung des Split-Ubiquitin-Komplexes keine besondere Lokalisation der Interaktionsproteine wie im klassischen Yeast-Two-Hybrid-System, nötig ist, so dass auch Interaktionen zwischen zwei Membranproteinen oder einem Membranprotein mit einem cytoplasmatischen Protein nachgewiesen werden können. Membranproteine können aufgrund ihrer hydrophoben Transmembrandomäne selten in den Zellkern transportiert werden und tendieren außerhalb von Membranen zu Aggregatbildung (Stagljär und Fields, 2002). Ebenso unterliegen viele Membranproteine posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung und Disulfidbrückenbindungen innerhalb des endoplasmatischen Retikulums, die im Zellkernmilieu nicht möglich sind (Thaminy et al., 2004). So gehen mit dem klassischen Yeast-Two-Hybrid-System alleine ein Drittel der möglichen Interaktionspartner dadurch verloren, dass die Proteine Membran-assoziiert sind (von Heijne, 2006). Daher könnte mittels der Verwendung des Split-Ubiquitin-Systems zusätzlich zu der hydrophilen cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin auch der Transmembrananteil des Proteins als Bindungspartner zur Verfügung stehen und so Protein-Wechselwirkungen in der physiologischen Umgebung ablaufen.

Der Nachweis einer nur geringen Anzahl von Interaktionspartnern der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin schließt daher nicht aus, dass es weitere Interaktionspartner gibt.

Die Identifikation dieser möglichen Bindungspartner mit den oben erwähnten alternativen Bindungsassays wäre das nächste Ziel zur Aufklärung L-Selektin-assoziiierter Signaltransduktionsprozesse.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass über die Identifizierung der Protein Phosphatase 2A (PP2A) ein weiterer Schritt in Richtung der Aufklärung der L-Selektin-Regulation über den Signalmodulationskomplex PKC, PP2A und PhapII gemacht werden konnte. PP2A konnte eine maßgebliche Rolle in der zellulären L-Selektin-Dephosphorylierung nachgewiesen werden. Obgleich technische Probleme für eine Co-Kristallisation von PhapII und L-Selektin überwunden werden müssen, konnten mit Hilfe von Mutationsanalysen interessante Einblicke in die Struktur von PhapII gewonnen werden, die zu einem verbesserten Verständnis aber auch zu einem besseren Umgang mit intrinsisch ungeordneten Proteinen beitragen dürfte. In initialen Experimenten konnte in T-Lymphozyten über eine bivalente Verstärkung von Signaltransduktionsereignissen durch zwei monoklonale anti-L-Selektin-Antikörper (DREG-55 und -200) die Sekretion von Cytokinen wie IL-2 und IL-10 nachgewiesen werden.

Abschließend konnte FBLP-1 als ein interessanter potentieller Interaktionspartner der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems identifiziert werden. FBLP-1 könnte eine Schlüsselrolle in der Weiterleitung von L-Selektin-vermittelten Signallingereignissen einnehmen, die in der Induktion der Genexpression resultiert. Damit wäre ein weiterer Schritt hin zum Verständnis des Mechanismus gelegt, dass eine Stimulation von L-Selektin zur Genexpression führt. Insgesamt konnte die hier vorgestellte Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung der Bedeutung der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin in zellulären Signaltransduktionsprozessen leisten.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, Y., Pavlakakis, G. N., Copeland, T. D. (1994). Identification of in vivo phosphorylation sites of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation breakpoint in acute undifferentiated leukemia. *FEBS Lett* 340 (3):231-235.
- Akazawa, H., Kudoh, S., Mochizuki, N., Takekoshi, N., Takano, H., Nagai, T., Komuro, I. (2004). A novel LIM protein Cal promotes cardiac differentiation by association with CSX/NKX2-5. *J Cell Biol* 164 (3):395-405.
- Allen, J. B., Wallberg, M. W., Edwards, M. C., Elledge, S. J. (1995). Finding prospective partners in the library: the yeast two-hybrid system and phage display find a match. *Trends Biochem Sci* 20 (12):511-516.
- Alon, R., Feizi, T., Yuen, C. T., Fuhlbrigge, R. C., Springer, T. A. (1995a). Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions. *J Immunol* 154 (10):5356-5366.
- Alon, R., Kassner, P. D., Carr, M. W., Finger, E. B., Hemler, M. E., Springer, T. (1995b). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 128 (6):1243-1253.
- Altman, A., Mally, M. I., Isakov, N. (1992). Phorbol ester synergizes with Ca^{2+} ionophore in activation of protein kinase C (PKC) α and PKC β isoenzymes in human T cells and in induction of related cellular functions. *Immunology* 76 (3):465-471.
- Altstaedt, J., Kirchner, H., Rink, L. (1996). Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology* 89 (4):563-568.
- Aronheim, A. (2001). Membrane recruitment systems for analysis of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 177:319-328.
- Bai, C., Elledge, S. (1997). Searching for interacting proteins with the two-hybrid system I. In *The Yeast Two-Hybrid System*. Bartel, P., Fields, S., (Hrsg.). New York: Oxford University Press. 1-28.
- Baier, G., Telford, D., Giampa, L., Coggeshall, K. M., Baier-Bitterlich, G., Isakov, N., Altman, A. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC θ , a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 268 (7):4997-5004.
- Balzar, M., Bakker, H. A., Briaire-de-Bruijn, I. H., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O., Litvinov, S. V. (1998). Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* 18 (8):4833-4843.
- Bartel, P. L., Roecklein, J. A., SenGupta, D., Fields, S. (1996). A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7. *Nat Genet* 12 (1):72-77.
- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A., Engert, A. (2000). Compatible-Solute-Supported Periplasmic Expression of Functional Recombinant Proteins under Stress Conditions. *Appl Environ Microbiol* 66 (4):1572-1579.
- Belmonte, P. A., Keil, L. B., DeBari, V. A. (1987). Characteristics of antibodies adsorbed on the DNA immunoabsorbent, agarose poly-L-lysine-DNA. *Diagn Clin Immunol* 5 (3):144-150.
- Beresford, P. J., Zhang, D., Oh, D. Y., Fan, Z., Greer, E. L., Russo, M. L., Jaju, M., Lieberman, J. (2001). Granzyme A Activates an Endoplasmic Reticulum-associated Caspase-independent Nuclease to Induce Single-stranded DNA Nicks. *J Biol Chem* 276 (46):43285-43293.
- Berg, E. L., Magnani, J., Warnock, R. A., Robinson, M. K., Butcher, E. C. (1992). Comparison of L-selectin and E-selectin ligand specificities: The L-selectin can

- bind the E-selectin ligands Sialyl Le(x) and Sialyl Le(a). *Biochem Biophys Res Commun* 184 (2):1048-1055.
- Berg, E. L., McEvoy, L. M., Berlin, C., Bargatze, R. F., Butcher, E. C. (1993). L-selectin mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 366 (6456):695-698.
- Berg, E. L., Yoshino, T., Rott, L. S., Robinson, M. K., Warnock, R. A., Kishimoto, T. K., Picker, L. J., Butcher, E. C. (1991). The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 174 (6):1461-1466.
- Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Kilshaw, P. J., Holzmann, B., Weissman, I. L., Hamann, A., Butcher, E. C. (1993). $\alpha 4\beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74 (1):185-195.
- Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M. (1993). Selectins. *J Clin Invest* 91 (2):379-87.
- Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S., Gimbrone, M. A., Ivetic, A. (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (24):9238-9242.
- Bialojan, C., Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256 (1):283-290.
- Blackwell, J. R., Horgan, R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett* 295 (1-3):10-12.
- Bochner, B. S., Luscinskas, R. W., Gimbrone, M. A., Newman, W., Sterbinsky, S. A., Derse-Anthony, C. P., Klunk, D., Schleimer, R. P. (1991). Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 173 (6):1553-1556.
- Bornhorst, J. A., Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In *Methods in Enzymology*, Vol. 326. Abelson, J. N., Simon, S. I., (Hrsg.). London: Academic Press. 245-254.
- Boudreau, R. T. M., Garduno, R., Lin, T.-J. (2002). Protein Phosphatase 2A and Protein Kinase C α Are Physically Associated and Are Involved in Pseudomonas aeruginosa-induced Interleukin 6 Production by Mast Cells. *J Biol Chem* 277 (7):5322-5329.
- Bowie, J. U., Sauer, R. T. (1989). Identification of C-terminal extensions that protect proteins from intracellular proteolysis. *J Biol Chem* 264 (13):7596-7602.
- Breider, M. A. (1993). Endothelium and inflammation. *J Am Vet Med Assoc* 203 (2):300-306.
- Brenner, B., Grassmé, H. U. C., Müller, C., Lang, F., Speer, C. P., Gulbins, E. (1998). L-Selectin Stimulates the Neutral Sphingomyelinase and Induces Release of Ceramide. *Exp Cell Res* 243 (1):123-128.
- Brenner, B., Gulbins, E., Schlottmann, K., Koppenhoefer, U., Busch, G. L., Walzog, B., Steinhausen, M., Coggeshall, K. M., Linderkamp, O., Lang, F. (1996). L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (26):15376-15381.
- Brenner, B., Weinmann, S., Grassme, H., Lang, F., Linderkamp, O., Gulbins, E. (1997). L-selectin activates JNK via src-like tyrosine kinases and the small G-protein Rac. *Immunology* 92 (2):214-219.
- Bula, C., Wilcox, K. W. (1996). Negative Effect of Sequential Serine Codons on Expression of Foreign Genes in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 7 (1):92-103.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., Short, J. M. (1987). X11-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5:376-378.

- Buscher, K., Riese, S. B., Shakibaei, M., Reich, C., Dervede, J., Tauber, R., Ley, K. (2010). The Transmembrane Domains of L-selectin and CD44 Regulate Receptor Cell Surface Positioning and Leukocyte Adhesion under Flow. *J Biol Chem* 285 (18):13490-13497.
- Carlos, T. M., Schwartz, B. R., Kovach, N. L., Yee, E., Rosa, M., Osborn, L., Chi-Rosso, G., Newman, B., Lobb, R., Harlan, J. M. (1990). Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 76 (5):965-970.
- Carpén, O., Pallai, P., Staunton, D. E., Springer, T. A. (1992). Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and α -actinin. *J Cell Biol* 118 (5):1223-1234.
- Carstens, C. P. (2003). Use of tRNA-supplemented host strains for expression of heterologous genes in *E. coli*. *Methods Mol Biol* 205:225-233.
- Cassatella, M. A. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16 (1):21-26.
- Cassatella, M. A. (1998). The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. *Int J Clin Lab Res* 28 (3):148-161.
- Cassatella, M. A. (1999). Neutrophil-Derived Proteins: Selling Cytokines by the Pound. In *Adv Immunol*, Vol. 73. Dixon, F. J., (Hrsg.). New York: Academic Press. 369-509.
- Cepek, K., Shaw, S., Parker, C., Russell, G., Morrow, J., Rimm, D., Brenner, M. (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the $\alpha^E\beta_7$ integrin. *Nature* 372 (6502):190-193.
- Cepek, K. L., Parker, C. M., Madara, J. L., Brenner, M. B. (1993). Integrin $\alpha^E\beta_7$ mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol* 150 (8):3459-3470.
- Cerdan, C., Martin, Y., Courcoul, M., Mawas, C., Birg, E., Olive, D. (1995). CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (α , β , γ) encoding the high-affinity IL2 receptor. *Res Immunol* 146 (3):164-168.
- Chakravarthy, B., Morley, P., Whitfield, J. (1999). Ca^{2+} -calmodulin and protein kinase Cs: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. *Trends Neurosci* 22 (1):12-16.
- Chamberlin, M., Ring, J. (1973). Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. 1. General properties of the enzymatic reaction and the template specificity of the enzyme. *J Biol Chem* 248 (6):2235-2211.
- Chambers, C. A., Allison, J. P. (1999). Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* 11 (2):203-210.
- Chang, J. D., Xu, Y., Raychowdhury, M. K., Ware, J. A. (1993). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a novel isoenzyme of protein kinase C (nPKC). A new member of the nPKC family expressed in skeletal muscle, megakaryoblastic cells, and platelets. *J Biol Chem* 268 (19):14208-14214.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125 (2, Supplement 2):S3-S23.
- Chen, C., Shang, X., Cui, L., Xu, T., Luo, J., Ba, X., Zeng, X. (2008). L-selectin ligation-induced CSF-1 gene transcription is regulated by AP-1 in a c-Abl kinase-dependent manner. *Hum Immunol* 69 (8):501-509.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (21):9578-9582.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (7):2172-2175.

- Clark, E. A., Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268 (5208):233-239.
- Crabtree, G. R. (1989). Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243 (4889):355-361.
- Crockett-Torabi, E. (1998). Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol* 63 (1):1-14.
- Crockett-Torabi, E., Sulenbarger, B., Smith, C. W., Fantone, J. C. (1995). Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol* 154 (5):2291-2302.
- da Costa Martins, P., Garcia-Vallejo, J.-J., van Thienen, J. V., Fernandez-Borja, M., van Gils, J. M., Beckers, C., Horrevoets, A. J., Hordijk, P. L., Zwaginga, J.-J. (2007). P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Is Expressed on Endothelial Cells and Mediates Monocyte Adhesion to Activated Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (5):1023-1029.
- de Marco, A., Vigh, L., Diamant, S., Goloubinoff, P. (2005). Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones* 10 (4):329-339.
- Dempsey, E. C., Newton, A. C., Mochly-Rosen, D., Fields, A. P., Reyland, M. E., Insel, P. A., Messing, R. O. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279 (3):L429-L438.
- Dimitroff, C. J., Lee, J. Y., Rafii, S., Fuhlbrigge, R. C., Sackstein, R. (2001). CD44 Is a Major E-Selectin Ligand on Human Hematopoietic Progenitor Cells. *J Cell Biol* 153 (6):1277-1286.
- Ding, Z., Issekutz, T. B., Downey, G. P., Waddell, T. K. (2003). L-selectin stimulation enhances functional expression of surface CXCR4 in lymphocytes: implications for cellular activation during adhesion and migration. *Blood* 101 (11):4245-4252.
- Disdier, M., Morrissey, J., Fugate, R., Bainton, D., McEver, R. (1992). Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway. *Mol Biol Cell* 3 (3):309-321.
- Dobrina, A., Menegazz, i. R., Carlos, T. M., Nardon, E., Cramer, R., Zacchi, T., Harlan, J. M., Patriarca, P. (1991). Mechanisms of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial cells. Eosinophils bind to the cytokine-induced ligand vascular cell adhesion molecule-1 via the very late activation antigen-4 integrin receptor. *J Clin Invest* 88 (1):20-26.
- Donnelly, S. C., Haslett, C., Dransfield, I., Robertson, C. E., Carter, D. C., Ross, J. A., Grant, I. S., Tedder, T. F. (1994). Role of selectins in development of adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 344 (8917):215-219.
- Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J., Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hipps, K. W., Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C. R., Bailey, R. W., Griswold, M. D., Chiu, W., Garner, E. C., Obradovic, Z. (2001). Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* 19 (1):26-59.
- Dwir, O., Kansas, G. S., Alon, R. (2001). Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leukocyte capture and rolling by increasing the mechanical stability of the selectin tether. *J Cell Biol* 155 (1):145-156.
- Ebnet, K., Vestweber, D. (1999). Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol* 112 (1):1-23.
- Edelman, G. M., Crossin, K. L. (1991). Cell Adhesion Molecules: Implications for a Molecular Histology. *Annu Rev Biochem* 60 (1):155-190.

- Elangbam, C. S., Qualls, C. W., Jr, Dahlgren, R. R. (1997). Cell adhesion molecules--update. *Vet Pathol* 34 (1):61-73.
- Elites, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. E., Lobb, R. R. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60 (4):577-584.
- Estanyol, J. M., Jaumot, M., Casanovas, O., Rodriguez-Vilarrupla, A., Agell, N., Bachs, O. (1999). The Protein SET Regulates the Inhibitory Effect of p21^{Cip1} on Cyclin E-Cyclin-dependent Kinase 2 Activity. *J Biol Chem* 274 (46):33161-33165.
- Esteve, V., Canela, N., Rodriguez-Vilarrupla, A., Aligué, R., Agell, N., Mingarro, I., Bachs, O., Pérez-Payá, E. (2003). The Structural Plasticity of the C Terminus of p21^{Cip1} is a Determinant for Target Protein Recognition. *Chem Bio Chem* 4 (9):863-869.
- Fabbri, M., Bianchi, E., Fumagalli, L., Pardi, R. (1999). Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules. *Inflamm Res* 48 (5):239-246.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Zhang, D., Xu, Z., Novina, C. D., Yoshida, A., Pommier, Y., Lieberman, J. (2003). Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol* 4 (2):145-153.
- Fantone, J. C., Ward, P. A. (1994). Inflammation. In *Pathology*. Rubin, E., Farber, J., (Hrsg.). Philadelphia: JB Lippincott Co. 33-66.
- Fieger, C. B., Sasseti, C. M., Rosen, S. D. (2003). Endoglycan, a Member of the CD34 Family, Functions as an L-selectin Ligand through Modification with Tyrosine Sulfation and Sialyl Lewis x. *J Biol Chem* 278 (30):27390-27398.
- Fields, S., Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340 (6230):245-246.
- Fields, S., Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10 (8):286-292.
- Fleming, J. C., Berger, G., Guichard, J., Cramer, E. M., Wagner, D. D. (1998). The transmembrane domain enhances granular targeting of P-selectin. *Eur J Cell Biol* 75 (4):331-343.
- Fontana, A., Zambonin, M., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Clementi, A., Scaramella, E. (1997). Probing the conformational state of apomyoglobin by limited proteolysis. *J Mol Biol* 266 (2):223-230.
- Foxall, C., Watson, S. R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L. A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., Brandley, B. K. (1992). The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope the sialyl Lewis X oligosaccharide. *J Cell Biol* 117 (4):895-902.
- Freeley, M., Volkov, Y., Kelleher, D., Long, A. (2005). Stimulus-induced phosphorylation of PKC θ at the C-terminal hydrophobic-motif in human T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 334 (2):619-630.
- Fuhlbrigge, R. C., King, S. L., Sackstein, R., Kupper, T. S. (2006). CD43 is a ligand for E-selectin on CLA⁺ human T cells. *Blood* 107 (4):1421-1426.
- Furukawa, Y., Umemoto, E., Jang, M. H., Tohya, K., Miyasaka, M., Hirata, T. (2008). Identification of Novel Isoforms of Mouse L-selectin with Different Carboxyl-terminal Tails. *J Biol Chem* 283 (18):12112-12119.
- Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* 37:273-328.
- Gallatin, W. M., Weissman, I. L., Butcher, E. C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304 (5921):30-34.
- Geng, J. G., Heavner, G. A., McEver, R. P. (1992). Lectin domain peptides from selectins interact with both cell surface ligands and Ca²⁺ ions. *J Biol Chem* 267 (28):19846-19853.

- Ghaffari-Tabrizi, N., Bauer, B., Villunger, A., Baier-Bitterlich, G., Altman, A., Utermann, G., Überall, F., Baier, G. (1999). Protein kinase C θ , a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *Eur J Immunol* 29 (1):132-142.
- Golemis, E. A., Khazak, V. (1997). Alternative yeast two-hybrid systems. The interaction trap and interaction mating. *Methods Mol Biol* 63:197-218.
- Golomb, M., Chamberlin, M. (1974). Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. IV. Resolution of the major in vitro transcripts by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 249 (9):2858-2863.
- Gómez-Gaviro, M., Domínguez-Luis, M., Canchado, J., Calafat, J., Janssen, H., Lara-Pezzi, E., Fourie, A., Tugores, A., Valenzuela-Fernández, A., Mollinedo, F., Sánchez-Madrid, F., Díaz-González, F. (2007). Expression and Regulation of the Metalloproteinase ADAM-8 during Human Neutrophil Pathophysiological Activation and Its Catalytic Activity on L-Selectin Shedding. *J Immunol* 178 (12):8053-8063.
- Gottesman, S. (1989). Genetics of Proteolysis in *Escherichia Coli*. *Annu Rev Genet* 23 (1):163-198.
- Graber, N., Gopal, T., Wilson, D., Beall, L., Polte, T., Newman, W. (1990). T cells bind to cytokine-activated endothelial cells via a novel, inducible sialoglycoprotein and endothelial leukocyte adhesion molecule- 1. *J Immunol* 145 (3):819-830.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol* 36 (1):59-72.
- Grailer, J. J., Koder, M., Steeber, D. A. (2009). L-selectin: Role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *J Dermatol Sci* 56 (3):141-147.
- Graumann, K., Premstaller, A. (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* 1 (2):164-186.
- Grayson, M. H., Van der Vieren, M., Sterbinsky, S. A., Gallatin, W. M., Hoffman, P. A., Staunton, D. E., Bochner, B. S. (1998). $\alpha\beta 2$ Integrin Is Expressed on Human Eosinophils and Functions as an Alternative Ligand for Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med* 188 (11):2187-2191.
- Green, C. E., Pearson, D. N., Christensen, N. B., Simon, S. I. (2003). Topographic requirements and dynamics of signaling via L-selectin on neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 284 (3):C705-C717.
- Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K. L., Prorock, A. J., Huo, Y., Ley, K. (2001). L-Selectin Shedding Regulates Leukocyte Recruitment. *J Exp Med* 193 (7):863-872.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Hannun, Y. A. (1994). The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 269 (5):3125-3128.
- Hansra, G., Bornancin, F., Whelan, R., Hemmings, B. A., Parker, P. J. (1996). 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Dephosphorylation of Protein Kinase C α Correlates with the Presence of a Membrane-associated Protein Phosphatase 2A Heterotrimer. *J Biol Chem* 271 (51):32785-32788.
- Haribabu, B., Steeber, D. A., Ali, H., Richardson, R. M., Snyderman, R., Tedder, T. F. (1997). Chemoattractant Receptor-induced Phosphorylation of L-selectin. *J Biol Chem* 272 (21):13961-13965.
- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 6 (4):387-400.

- Hemmerich, S., Butler, E. C., Rosen, S. D. (1994). Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, and adhesion-blocking monoclonal antibody. *J Exp Med* 180 (6):2219-2226.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1992). The Ubiquitin System for Protein Degradation. *Annu Rev Biochem* 61 (1):761-807.
- Hsu-Lin, S., Berman, C. L., Furie, B. C., August, D., Furie, B. (1984). A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin- activated platelets. *J Biol Chem* 259 (14):9121-9126.
- Hu, Y., Kiely, J.-M., Szente, B. E., Rosenzweig, A., Gimbrone, M. A. (2000). E-Selectin-Dependent Signaling Via the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Vascular Endothelial Cells. *J Immunol* 165 (4):2142-2148.
- Huang, K. S., Graves, B. J., Wolitzky, B. A. (1997). Functional analysis of selectin structure. In *The Selectins* Vadas, M. A., Harlan, J., (Hrsg.). New York: Harwood Academic Publishers. 1-29.
- Huston, D. P. (1997). The biology of the immune system. *JAMA* 278 (22):1804-1814.
- Hwang, S., Singer, M. S., Giblin, P. A., Yednock, T. A., Bacon, K. B., Simon, S. I., Rosen, S. D. (1996). GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates β_2 -integrins on native peripheral lymphocytes. *J Exp Med* 184 (4):1343-1348.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* 69 (1):11-25.
- Ivetic, A., Deka, J., Ridley, A., Ager, A. (2002). The Cytoplasmic Tail of L-selectin Interacts with Members of the Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Family of Proteins. *J Biol Chem* 277 (3):2321-2329.
- Ivetic, A., Florey, O., Deka, O., Haskard, D. O., Ager, A., Ridley, A. J. (2004). Mutagenesis of the Ezrin-Radixin-Moesin Binding Domain of L-selectin Tail Affects Shedding, Microvillar Positioning, and Leukocyte Tethering. *J Biol Chem* 279 (32):33263-33272.
- Ivetic, A., Ridley, A. J. (2004a). Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology* 112 (2):165-176.
- Ivetic, A., Ridley, A. J. (2004b). The telling tail of L-selectin. *Biochem Soc Trans* 32 (16):1118-1121.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8 (6):1693-1696.
- Jacobson, B. S., Branton, D. (1977). Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads. *Science* 195 (4275):302-304.
- James, P. (2001). Yeast two-hybrid vectors and strains. *Methods Mol Biol* 177:41-84.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). *Immunologie*, 5. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad Verl.
- Janssens, V., Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353 (Pt 3):417-39.
- Johnson, J. P., Stade, B. G., Holzmann, B., Schwable, W., Riethmuller, G. (1989). De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86 (2):641-644.
- Johnson, L. A., Jackson, D. G. (2008). Cell Traffic and the Lymphatic Endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 1131 (1):119-133.
- Johnsson, N., Varshavsky, A. (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (22):10340-10344.

- Juliano, R. L., Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 120 (3):577-585.
- Jungbauer, A., Hahn, R. (2009). Ion-exchange chromatography. In *Methods in Enzymology*, Vol. 463. Abelson, J. N., Simon, S. I., (Hrsg.). London: Academic Press.
- Jutila, M. A. (1992). Leukocyte traffic to sites of inflammation. *APMIS* 100 (3):191-201.
- Kaba, N. K., Schultz, J., Law, F.-Y., Lefort, C. T., Martel-Gallegos, G., Kim, M., Waugh, R. E., Arreola, J., Knauf, P. A. (2008). Inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger enhances low pH-induced L-selectin shedding and β 2-integrin surface expression in human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 295 (5):C1454-C1463.
- Kahn, J., Walcheck, B., Migaki, G. I., Jutila, M. A., Kishimoto, T. K. (1998). Calmodulin Regulates L-Selectin Adhesion Molecule Expression and Function through a Protease-Dependent Mechanism. *Cell* 92 (6):809-818.
- Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. *Curr Opin Biotechnol* 6 (5):494-500.
- Kansas, G. S. (1996). Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88 (9):3259-3287.
- Kansas, G. S., Ley, K., Munro, J. M., Tedder, T. F. (1993). Regulation of leukocyte rolling and adhesion to high endothelial venules through the cytoplasmic domain of L-selectin. *J Exp Med* 177 (3):833-838.
- Karetsou, Z., Emmanouilidou, A., Sanidas, I., Liokatis, S., Nikolakaki, E., Politou, A. S., Papamarcaki, T. (2009). Identification of distinct SET/TAF-I β domains required for core histone binding and quantitative characterisation of the interaction. *BMC Biochem* 10 (10).
- Kasheverov, I., Utkin, Y., Weise, C., Franke, P., Hucho, F., Tsetlin, V. (1998). Reverse-Phase Chromatography Isolation and MALDI Mass Spectrometry of the Acetylcholine Receptor Subunits. *Protein Expr Purif* 12 (2):226-232.
- Kavanaugh, A. E., Lightfoot, E., Lipsky, P. E., Oppenheimer- Marks, N. (1991). Role of CD11/CD18 in adhesion and transendothelial migration of T cells. Analysis utilizing CD18-deficient T cell clones. *J Immunol* 146 (12):4149- 4156.
- Kellogg, D. R., Kikuchi, A., Fujii-Nakata, T., Turck, C. W., Murray, A. W. (1995). Members of the NAP/SET Family of Proteins Interact Specifically with B-Type Cyclins. *J Cell Biol* 130 (3):661-673.
- Keranen, L. M., Dutil, E. M., Newton, A. C. (1995). Protein kinase C is regulated *in vivo* by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 5 (12):1394-1403.
- Kerr, S. C., Fieger, C. B., Snapp, K. R., Rosen, S. D. (2008). Endoglycan, a Member of the CD34 Family of Sialomucins, Is a Ligand for the Vascular Selectins. *J Immunol* 181 (2):1480-1490.
- Khan, A. I., Landis, R. C., Malhotra, R. (2003). L-Selectin Ligands in Lymphoid Tissues and Models of Inflammation. *Inflammation* 27 (5):265-280.
- Kieffer, J. D., Plopper, G., Ingber, D. E., Hartwig, J. H., Kupper, T. S. (1995). Direct Binding of F Actin to the Cytoplasmic Domain of the α 2 Integrin Chain *in Vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 217 (2):466-474.
- Kilian, K. (2002). Identification of novel interaction partners for the leukocyte adhesion molecule L-selectin. In *Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie*. Berlin: Freie Universität 124.
- Kilian, K., Darnedde, J., Mueller, E.-C., Bahr, I., Tauber, R. (2004). The Interaction of Protein Kinase C Isozymes α , ι , and θ with the Cytoplasmic Domain of L-selectin Is Modulated by Phosphorylation of the Receptor. *J Biol Chem* 279 (33):34472-34480.

- Killock, D. J., Ivetic, A. (2010). The cytoplasmic domains of TNF α -converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. *Biochem J* 428 (2):293-304.
- Kishimoto, A., Nishiyama, K., Nakanishi, H., Uratsuji, Y., Nomura, H., Takeyama, Y., Nishizuka, Y. (1985). Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 260 (23):12492-12499.
- Koedam, J. A., Cramer, E. M., Briend, E., Furie, B., Furie, B. C., Wagner, D. D. (1992). P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J Cell Biol* 116 (3):617-625.
- Koken, M. H. M., Odijk, H. H. M., Vanduin, M., Fornerod, M., Hoeijmakers, J. H. J. (1993). Augmentation of Protein Production by a Combination of the T7 RNA Polymerase System and Ubiquitin Fusion: Overproduction of the Human DNA Repair Protein, ERCC1, as a Ubiquitin Fusion Protein in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 195 (2):643-653.
- Korade-Mirnics, Z., Corey, S. J. (2000). Src kinase-mediated signaling in leukocytes. *J Leukoc Biol* 68 (5):603-613.
- Kotovuori, P., Tontti, E., Pigott, R., Shepherd, M., Kiso, M., Hasegawa, A., Renkonen, R., Nortamo, P., Altieri, D. C., Gahmberg, C. G. (1993). The vascular E-selectin binds to the leukocyte integrins CD11/CD18. *Glycobiology* 3 (2):131-136.
- Krause, M., Dent, E. W., Bear, J. E., Loureiro, J. J., Gertler, F. B. (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:541-564.
- Krensky, A., Sanchez-Madrid, F., Robbins, E., Nagy, J., Springer, T., Burakoff, S. (1983). The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J Immunol* 131 (2):611-616.
- Krensky, A. M., Robbins, E., Springer, T. A., Burakoff, S. J. (1984). LFA-1, LFA-2, and LFA-3 antigens are involved in CTL-target conjugation. *J Immunol* 132 (5):2180-2182.
- Kubin, M., Kamoun, M., Trinchieri, G. (1994). Interleukin 12 Synergizes with B7/CD28 Interaction in Inducing Efficient Proliferation and Cytokine Production of Human T Cells. *J Exp Med* 180 (1):211-222.
- Kutney, S. N., Hong, R., Macfarlan, T., Chakravarti, D. (2004). A Signaling Role of Histone-binding Proteins and INHAT Subunits pp32 and Set/TAF-I β in Integrating Chromatin Hypoacetylation and Transcriptional Repression. *J Biol Chem* 279 (29):30850-30855.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- Lasky, L. A. (1992). Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258 (5084):964-969.
- Laudanna, C., Constantin, G., Baron, P., Scarpini, E., Scarlato, G., Cabrini, G., Dehecchi, C., Rossi, F., Cassatella, M. A., Berton, G. (1994). Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *J Biol Chem* 269 (6):4021-4026.
- Lazo, P. S., Ochoa, A. G., Gascón, S. (1977). α -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. Cellular localization, and purification of the external enzyme. *Eur J Biochem* 77 (2):375-382.

- Lee, D., Schultz, J. B., Knauf, P. A., King, M. R. (2007). Mechanical Shedding of L-selectin from the Neutrophil Surface during Rolling on Sialyl Lewis x under Flow. *J Biol Chem* 282 (7):4812-4820.
- Lee, K.-Y., D'Acquisto, F., Hayden, M. S., Shim, J.-H., Ghosh, S. (2005). PDK1 Nucleates T Cell Receptor-Induced Signaling Complex for NF- κ B Activation. *Science* 308 (5718):114-118.
- Legg, J. W., Isacke, C. M. (1998). Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Curr Biol* 8 (12):705-708.
- Ley, K. (2003). Sulfated Sugars for Rolling Lymphocytes. *J Exp Med* 198 (9):1285-1288.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7 (9):678-689.
- Li, A., Kato, Z., Ohnishi, H., Hashimoto, K., Matsukuma, E., Omoya, K., Yamamoto, Y., Kondo, N. (2003). Optimized gene synthesis and high expression of human interleukin-18. *Protein Expr Purif* 32 (1):110-118.
- Li, B., Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J* 7 (10):957-963.
- Li, M., Guo, H., Damuni, Z. (1995). Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry* 34 (6):1988-1996.
- Li, M., Makkinje, A., Damuni, Z. (1996). The Myeloid Leukemia-associated Protein SET Is a Potent Inhibitor of Protein Phosphatase 2A. *J Biol Chem* 271 (19):11059-11062.
- Lieberman, J., Fan, Z. (2003). Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 15 (5):553-559.
- Lindsley, D., Gallant, J. (1993). On the directional specificity of ribosome frameshifting at a "hungry" codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (12):5469-5473.
- Linsley, P. S., Ledbetter, J. A. (1993). The Role of the CD28 Receptor During T Cell Responses to Antigen. *Annu Rev Biochem* 11 (1):191-212.
- Liu, Y., Graham, C., Li, A., Fisher, R. J., Shaw, S. (2002). Phosphorylation of the protein kinase C- θ activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation is critical to *in vivo* nuclear-factor- κ B induction. *Biochem J* 361 (2):255-265.
- Liu, Y., Witte, S., Liu, Y. C., Doyle, M., Elly, C., Altman, A. (2000). Regulation of protein kinase C θ function during T cell activation by Lck-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 275 (5):3603-3609.
- Lobb, R. R. (1992). Integrin-immunoglobulin superfamily interactions in endothelial-leukocyte adhesion. In *Adhesion. Its Role in Inflammatory Disease*. Harlan, J. M., Liu, D. Y., (Hrsg.). New York, NY: WH Freeman and Co. 1-18.
- Lorenzon, P., Vecile, E., Nardon, E., Ferrero, E., Harlan, J. M., Tedesco, F., Dobrina, A. (1998). Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol* 142 (5):1381-1391.
- Lowe, J. B. (1997). The carbohydrate components of selectin ligands. In *The Selectins: initiators of leukocyte endothelial adhesion*. Vestveber, D., (Hrsg.). Reading, United Kingdom: Harwood Academic Publishers. 143-177.
- Ludowyke, R. I., Holst, J., Mudge, L.-M., Sim, A. T. R. (2000). Transient Translocation and Activation of Protein Phosphatase 2A during Mast Cell Secretion. *J Biol Chem* 275 (9):6144-6152.
- Luft, J. R., DeTitta, G. T. (2009). Rational Selection of Crystallization Techniques. In *Protein Crystallization*. Bergfors, T. M., (Hrsg.). LaJolla, CA: International University Line. 11-46.

- Luster, A. D. (1998). Chemokines -- Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *N Engl J Med* 338 (7):436-445.
- Makgoba, K., Sanders, M. E., Shaw, S. (1989). The CD2-LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways: relevance to T-cell recognition. *Immunol Today* 10 (12):417-422.
- Manicassamy, S., Gupta, S., Sun, Z. (2006). Selective function of PKC- θ in T cells. *Cell Mol Immunol* 3 (4):263-270.
- Matala, E., Alexander, S. R., Kishimoto, T. K., Walcheck, B. (2001). The Cytoplasmic Domain of L-Selectin Participates in Regulating L-Selectin Endoproteolysis. *J Immunol* 167 (3):1617-1623.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Kikuchi, A., Tsujimoto, M. (1999). Sperm Chromatin Decondensation by Template Activating Factor I through Direct Interaction with Basic Proteins. *Mol Cell Biol* 19 (10):6940-6952.
- Matsumoto, K., Nagata, K., Ui, M., Hanaoka, F. (1993). Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication. *J Biol Chem* 268 (14):10582-10587.
- Matsumoto, M., Atarashi, K., Umemoto, E., Furukawa, Y., Shigeta, A., Miyasaka, M., Hirata, T. (2005). CD43 Functions as a Ligand for E-Selectin on Activated T Cells. *J Immunol* 175 (12):8042-8050.
- McBryant, S. J., Park, Y.-J., Abernathy, S. M., Laybourn, P. J., Nyborg, J. K., Luger, K. (2003). Preferential Binding of the Histone (H3-H4)₂ Tetramer by NAP1 Is Mediated by the Amino-terminal Histone Tails. *J Biol Chem* 278 (45):44574-44583.
- McEver, R. P. (1994). Selectins. *Curr Opin Immunol* 6 (1):75-84.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.-X., Abo, A., Karin, M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81 (7):1147-1157.
- Miyaji-Yamaguchi, M., Okuwaki, M., Nagata, K. (1999). Coiled-coil Structure-mediated Dimerization of Template Activating Factor-I is Critical for Its Chromatin Remodeling Activity. *J Mol Biol* 290 (2):547-557.
- Mochly-Rosen, D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268 (5208):247-251.
- Moore, K. L. (1998). Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma* 29 (1-2):1-15.
- Moore, K. L., Patel, K. D., Bruehl, R. E., Li, F., Johnson, D. A., Lichenstein, H. S., Cummings, R. D., Bainton, D. F., McEver, R. P. (1995). P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 128 (4):661-671.
- Mosser, D. M., Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 226 (1):205-218.
- Murakawa, Y., Minami, Y., Strober, W., James, S. P. (1992). Association of human lymph node homing receptor (Leu 8) with the TCR/CD3 complex. *J Immunol* 148 (6):1771-1776.
- Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., Horikoshi, M. (2007). Relationship between the structure of SET/TAF-I β /INHAT and its histone chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (11):4285-4290.
- Najbar, L. V., Craik, D. J., Wade, J. D., Salvatore, D., McLeish, M. J. (1997). Conformational analysis of LYS(11-36), a peptide derived from the beta-sheet region of T4 lysozyme, in TFE and SDS. *Biochemistry* 36 (38):11525-11533.
- Ng, T., Parsons, M., Hughes, W. E., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., Arpin, M., Gschmeissner, S., Verveer, P. J., Bastiaens, P. I. H., Parker, P. J. (2001). Ezrin is a

- downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J* 20 (11):2723-2741.
- Nishijima, K.-i., Ando, M., Sano, S., Hayashi-Ozawa, A., Kinoshita, Y., Iijima, S. (2005). Costimulation of T-cell proliferation by anti-I-selectin antibody is associated with the reduction of a cdk inhibitor p27. *Immunology* 116 (3):347-353.
- O'Garra, A., Vieira, P. (2007). TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7 (6):425-428.
- Okuwaki, M., Nagata, K. (1998). Template Activating Factor-I Remodels the Chromatin Structure and Stimulates Transcription from the Chromatin Template. *J Biol Chem* 273 (51):34511-34518.
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T. C., Suzuki, K., Kuroki, T., Ohno, S. (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC θ , predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 12 (9):3930-3938.
- Otey, C. A., Pavalko, F. M., Burrridge, K. (1990). An interaction between α -actinin and the β_1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol* 111 (2):721-729.
- Parekh, D. B., Ziegler, W., Parker, P. J. (2000). Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 19 (4):496-503.
- Park, Y.-J., Luger, K. (2006). The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (5):1248-1253.
- Paulsen, J. C. (1992). Selectin/carbohydrate-mediated adhesion of leukocyte. In *Adhesion. Its Role in Inflammatory Disease*. M, H. J., Y, L. D., (Hrsg.). New York: WH Freeman and Co. 19-42.
- Pavalko, F. M., LaRoche, S. M. (1993). Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin β_2 -subunit (CD18) and the actin binding protein α -actinin. *J Immunol* 151 (7):3795-3807.
- Pavalko, F. M., Otey, C. A. (1994). Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating interactions with the cytoskeleton. *Proc Soc Exp Biol Med* 205 (4):282-293.
- Pavalko, F. M., Walker, D. M., Graham, L., Goheen, M., Doerschuk, C. M., Kansas, G. S. (1995). The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via α -actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with α -actinin. *J Cell Biol* 129 (4):1155-1164.
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., Black, R. A. (1998). An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science* 282 (5392):1281-1284.
- Phizicky, E. M., Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59 (1):94-123.
- Pietromonaco, S. F., Simons, P. C., Altman, A., Elias, L. (1998). Protein Kinase C- θ Phosphorylation of Moesin in the Actin-binding Sequence. *J Biol Chem* 273 (13):7594-7603.
- Prosinecki, V., Faisca, P. F. N., Gomes, C. M. (2007). Conformational States and Protein Stability from a Proteomic Perspective. *Curr Proteomics* 4 (1):44-52.
- Qiagen. (2003). *The QIAexpressionist™: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Fifth Edition*. Hilden: QIAGEN GmbH.
- Qinwei, S., Jackowski, G. (2002). One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach* Hames, B. D., (Hrsg.). New York Oxford University Press. 32.

- Qu, D., Li, Q., Lim, H.-Y., Cheung, N. S., Li, R., Wang, J. H., Qi, R. Z. (2002). The Protein SET Binds the Neuronal Cdk5 Activator p35^{nck5a} and Modulates Cdk5/p35^{nck5a} Activity. *J Biol Chem* 277 (9):7324-7332.
- Ramasamy, P., El-Maghrabi, M. R., Halada, G., Miller, L. M., Rafailovich, M. (2007). Examination of Interactions of Oppositely Charged Proteins in Gels. *Langmuir* 23 (4):2021-2029.
- Reznikoff, W., Gold, L. (1986). *Maximizing Gene Expression*. Butterworth, Stoneham, MA.
- Ricciarelli, R., Azzi, A. (1998). Regulation of Recombinant PKC α Activity by Protein Phosphatase 1 and Protein Phosphatase 2A. *Arch Biochem Biophys* 355 (2):197-200.
- Rice, G. E., Munro, J. M., Bevilacqua, M. P. (1990). Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism. *J Exp Med* 171 (4):1369-1374.
- Rizoli, S. B., Rotstein, O. D., Kapus, A. (1999). Cell Volume-dependent Regulation of L-selectin Shedding in Neutrophils. *J Biol Chem* 274 (31):22072-22080.
- Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L., Juliano, R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta* 1242 (1):77-98.
- Sahdev, S., Khattar, S., Saini, K. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem* 307 (1):249-264.
- Saito, S., Miyaji-Yamaguchi, M., Shimoyama, T., Nagata, K. (1999). Functional Domains of Template-Activating Factor-I as a Protein Phosphatase 2A Inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 259 (2):471-475.
- Sako, D., Chang, X. J., Barone, K. M., Vachino, G., White, H. M., Shaw, G., Veldman, G. M., Bean, K. M., Ahern, T. J., Furie, B., et al. (1993). Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75 (6):1179-1186.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., (Hrsg.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12):5463-5467.
- Sassetti, C., Tangemann, K., Singer, M. S., Kershaw, D. B., Rosen, S. D. (1998). Identification of Podocalyxin-like Protein as a High Endothelial Venule Ligand for L-selectin: Parallels to CD34. *J Exp Med* 187 (12):1965-1975.
- Sato, N., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. (1992). A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci* 103 (1):131-143.
- Savage, C. O. S., Hughes, C. C. W., Pepinsky, R. B., Wallner, B. P., Freedman, A. S., Poher, J. S. (1991). Endothelial cell lymphocyte function-associated antigen-3 and an unidentified ligand act in concert to provide costimulation to human peripheral blood CD4⁺ T cells. *Cell Immunol* 137 (1):150-163.
- Schneider, R., Bannister, A. J., Weise, C., Kouzarides, T. (2004). Direct Binding of INHAT to H3 Tails Disrupted by Modifications. *J Biol Chem* 279 (23):23859-23862.
- Schneider, U., Schwenk, H. U., Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19 (5):621-626.
- Schwartz, M. A. (1992). Transmembrane signalling by integrins. *Trends Cell Biol* 2 (10):304-308.

- Seo, S.-b., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W. S., Chakravarti, D. (2001). Regulation of Histone Acetylation and Transcription by INHAT, a Human Cellular Complex Containing the Set Oncoprotein. *Cell* 104 (1):119-130.
- Serebriiskii, I. G., Golemis, E. A. (2001). Two-Hybrid System and False Positives. Approaches to Detection and Elimination. *Methods Mol Biol* 177:123-134.
- Sicheri, F., Kuriyan, J. (1997). Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol* 7 (6):777-785.
- Sim, A. T. R., Scott, J. D. (1999). Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell Calcium* 26 (5):209-217.
- Simon, S. I., Burns, A. R., Taylor, A. D., Gopalan, P. K., Lynam, E. B., Sklar, L. A., Smith, C. W. (1995). L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) β_2 -integrin. *J Immunol* 155 (3):1502-1514.
- Simon, S. I., Cherapanov, V., Nadra, I., Waddell, T. K., Seo, S. M., Wang, Q., Doerschuk, C. M., Downey, G. P. (1999). Signaling Functions of L-Selectin in Neutrophils: Alterations in the Cytoskeleton and Colocalization with CD18. *J Immunol* 163 (5):2891-2901.
- Sipley, J., Goldman, E. (1993). Increased ribosomal accuracy increases a programmed translational frameshift in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (6):2315-2319.
- Skinner, M. P., Lucas, C. M., Burns, G. F., Chesterman, C. N., Berndt, M. C. (1991). GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. *J Biol Chem* 266 (9):5371-5374.
- Smalley, D. M., Ley, K. (2005). L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med* 9 (2):255-266.
- Smith, D. B., Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67 (1):31-40.
- Smolen, J. E., Petersen, T. K., Koch, C., O'Keefe, S. J., Hanloni, W. A., Seo, S. M., Pearson, D., Fossett, M. C., Simon, S. I. (2000). L-Selectin Signaling of Neutrophil Adhesion and Degranulation Involves p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem* 275 (21):15876-15884.
- Sönnichsen, F. D., Van Eyk, J. E., Hodges, R. S., Sykes, B. D. (1992). Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry* 31 (37):8790-8798.
- Soung, G. Y., Miller, J. L., Koc, H., Koc, E. C. (2009). Comprehensive Analysis of Phosphorylated Proteins of *Escherichia coli* Ribosomes. *J Proteome Res* 8 (7):3390-3402.
- Spertini, O., Freedman, A. S., Belvin, M. P., Penta, A. C., Griffin, J. D., Tedder, T. F. (1991). Regulation of leukocyte adhesion molecule-1 (TQ1, Leu-8) expression and shedding by normal and malignant cells. *Leukemia* 5 (4):300-308.
- Springer, T. A. (1994). Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multistep Paradigm. *Cell* 76 (2):301-314.
- Stagljar, I., Fields, S. (2002). Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. *Trends Biochem Sci* 27 (11):559-562.
- Steehmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H. P., Kleuser, B., Vestweber, D. (1995). The E-selectin ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 373 (6515):615-620.
- Stüber, D., Bujard, H. (1982). Transcription from efficient promoters can interface with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. *EMBO J* 1:1399-1404.
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219 (1):37-44.

- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189 (1):113-130.
- Studier, W. F., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. In *Methods in Enzymology*, Vol. 185. Abelson, J. N., Melvin, S. I., (Hrsg.). London: Academic Press. 60-89.
- Swamy, K. H., Goldberg, A. L. (1982). Subcellular distribution of various proteases in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 149 (3):1027-1033.
- Takafuta, T., Saeki, M., Fujimoto, T.-T., Fujimura, K., Shapiro, S. S. (2003). A New Member of the LIM Protein Family Binds to Filamin B and Localizes at Stress Fibers. *J Biol Chem* 278 (14):12175-12181.
- Takeuchi, K., Sato, N., Kasahara, H., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. (1994). Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J Cell Biol* 125 (6):1371-1384.
- Talmadge, K., Gilbert, W. (1982). Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (6):1830-1833.
- Tanford, C. (1968). Protein denaturation. *Adv Protein Chem* 23:121-282.
- Tatosyan, A. G., Mizenina, O. A. (2000). Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* 65 (1):49-58.
- Taub, D. D. (1996). Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well. *Cytokine Growth Factor Rev* 7 (4):355-376.
- Tcherkasskaya, O., Uversky, V. N. (2001). Denatured collapsed states in protein folding: Example of apomyoglobin. *Proteins* 44 (3):244-254.
- Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A., Engel, P. (1995). The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9 (10):866-873.
- ten Klooster, J. P., Leeuwen, I. v., Scheres, N., Anthony, E. C., Hordijk, P. L. (2007). Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J* 26 (2):336-345.
- Thaminy, S., Miller, J., Stagljar, I. (2004). The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 261:297-312.
- Thuille, N., Heit, I., Fresser, F., Krumbock, N., Bauer, B., Leuthaeusser, S., Dammeier, S., Graham, C., Copeland, T. D., Shaw, S., Baier, G. (2005). Critical role of novel Thr-219 autophosphorylation for the cellular function of PKC θ in T lymphocytes. *EMBO J* 24 (22):3869-3880.
- Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* 27 (10):527-533.
- Tu, L., Delahunty, M. D., Ding, H., Luscinskas, F. W., Tedder, T. F. (1999). The Cutaneous Lymphocyte Antigen Is an Essential Component of the L-selectin Ligand Induced on Human Vascular Endothelial Cells. *J Exp Med* 189 (2):241-252.
- Tu, Y., Wu, S., Shi, X., Chen, K., Wu, C. (2003). Migfilin and Mig-2 Link Focal Adhesions to Filamin and the Actin Cytoskeleton and Function in Cell Shape Modulation. *Cell* 113 (1):37-47.
- Tyrrell, D., James, P., Rao, V., Foxall, C., Abbas, S., Dasgupta, F., Nashed, M., Hasagawa, A., Kiso, M., Asa, D. (1991). Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (22):10372-10376.
- Uversky, V. N. (2002). What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* 269 (1):2-12.
- Van Aelst, L., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A., Wigler, M. (1993). Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (13):6213-6217.

- Viitanen, M., Vasala, A., Neubauer, P., Alatossava, T. (2003). Cheese whey-induced high-cell-density production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 2 (1):2.
- Vogetseder, W., Feichtinger, H., Schulz, T. E., Schwaeble, W., Tabaczewski, P., Mitterer, M., Block, G., March, C., Dapunt, Mikuz, G., Dierch, M. P. (1989). Expression of 7F7-antigen, a human adhesion molecule identical to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human carcinomas and their stromal fibroblasts. *Int J Cancer* 43 (5):768-773.
- von Andrian, U. H., Hasslen, S. R., Nelson, R. D., Erlandsen, S. L., Butcher, E. C. (1995). A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 82 (6):989-999.
- von Asmuth, E. J. U., Smeets, E. F., Ginsel, L. A., Onderwater, J. J. M., Leeuwenberg, J. F. M., Buurman, W. A. (1992). Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. *Eur J Immunol* 22 (10):2519-2526.
- von Gabain, A., Bujard, H. (1977). Interaction of *E. coli* RNA polymerase with promoters of coliphage T5. *Molec Gen Genet* 157:301-311.
- von Heijne, G. (2006). Membrane-protein topology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (12):909-918.
- von Lindern, M., van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeijer, A., Grosveld, G. (1992). Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol* 12 (8):3346-3355.
- Waddell, T. K., Fialkow, L., Chan, C. K., Kishimoto, T. K., Downey, G. P. (1995). Signaling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase. *J Biol Chem* 270 (25):15403-15411.
- Walcheck, B., Alexander, S. R., St. Hill, C. A., Matala, E. (2003). ADAM-17-independent shedding of L-selectin. *J Leukoc Biol* 74 (3):389-394.
- Wange, R. L. (2000). LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways. *Sci STKE* 2000 (63):RE1.
- Ward, S. G., Marelli-Berg, F. M. (2009). Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *Biochem J* 418 (1):13-27.
- Watson, S. R., Imai, Y., Fennie, C., Geoffrey, J., Singer, M., Rosen, S. D., Lasky, L. A. (1991). The complement binding-like domains of the murine homing receptor facilitate lectin activity. *J Cell Biol* 115 (1):235-243.
- Watts, T. H., DeBenedette, M. A. (1999). T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol* 11 (3):286-293.
- Way, K. J., Chou, E., King, G. L. (2000). Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci* 21 (5):181-187.
- Webb, B. L., Hirst, S. J., Giembycz, M. A. (2000). Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol* 130 (7):1433-1452.
- Weber, K. S., Klickstein, L. B., Weber, C. (1999). Specific activation of leukocyte β 2 integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the α subunit cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell* 10 (4):861-873.
- Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A., Olins, P. O. (1996). Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 7 (5):494-499.

- Williams, A. F., Barclay, A. N., Clark, S. J., Paterson, D. J., Willis, A. C. (1987). Similarities in sequences and cellular expression between rat CD2 and CD4 antigens. *J Exp Med* 165 (2):368-380.
- Williams, M. J., Hughes, P. E., O'Toole, T. E., Ginsberg, M. H. (1994). The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol* 4 (4):109-112.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80 (5):617-653.
- Wright, P. E., Dyson, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 293 (2):321-331.
- Xu, T., Chen, L., Shang, X., Cui, L., Luo, J., Chen, C., Ba, X., Zeng, X. (2008). Critical role of Lck in L-selectin signaling induced by sulfatides engagement. *J Leukoc Biol* 84 (4):1-10.
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., Harrison, S. C. (1999). Crystal Structures of c-Src Reveal Features of Its Autoinhibitory Mechanism. *Mol Cell* 3 (5):629-638.
- Yamaguchi, H., Hendrickson, W. A. (1996). Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* 384 (6608):484-489.
- Yndestad, A., Holm, A. M., Muller, F., Simonsen, S., Froland, S. S., Gullestad, L., Aukrust, P. (2003). Enhanced expression of inflammatory cytokines and activation markers in T-cells from patients with chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 60 (1):141-146.
- Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S. (1998). Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140 (4):885-895.
- Yoshida, M., Szente, B. E., Kiely, J.-M., Rosenzweig, A., Gimbrone, M. A. (1998). Phosphorylation of the Cytoplasmic Domain of E-Selectin Is Regulated During Leukocyte-Endothelial Adhesion. *J Immunol* 161 (2):933-941.
- Yoshida, M., Westlin, W. F., Wang, N., Ingber, D. E., Rosenzweig, A., Resnick, N., Gimbrone, M. A. (1996). Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 133 (2):445-455.
- Zhang, J., Lautar, S. (1996). A Yeast Three-Hybrid Method to Clone Ternary Protein Complex Components. *Anal Biochem* 242 (1):68-72.
- Zhao, J., Zhang, Y., Ithychanda, S. S., Tu, Y., Chen, K., Qin, J., Wu, C. (2009). Migfilin Interacts with Src and Contributes to Cell-Matrix Adhesion-mediated Survival Signaling. *J Biol Chem* 284 (49):34308-34320.
- Zhao, L., Shey, M., Farnsworth, M., Dailey, M. (2001). Regulation of membrane metalloproteolytic cleavage of L-selectin (CD62L) by the epidermal growth factor domain. *J Biol Chem* 276 (33):30631-30640.
- Zhu, Y. Y., Machleder, E. M., Chenchik, A., Li, R., Siebert, P. D. (2001). Reverse transcriptase template switching: A SMART™ approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* 30 (4):892-897.
- Zollner, O., Lenter, M. C., Blanks, J. E., Borges, E., Steegmaier, M., Zerwes, H.-G., Vestweber, D. (1997). L-Selectin from Human, but Not from Mouse Neutrophils Binds Directly to E-Selectin. *J Cell Biol* 136 (3):707-716.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	amino acids
ad	Auffüllen auf ... mit ...
Amp ^r	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	Doppelstrang
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk	extrazellulär-regulierte Kinase
FBLP-1	Filamin-binding LIM Protein 1
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung in m/s ²
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish-Peroxidase
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactosid
IU/l	International Units per milliliter
Kan ^r	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	<i>Luria-Bertani</i> -Medium
LScyto	cytoplasmatische Domäne von L-Selektin
Lys	Lysin
M	Molar
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	multiple cloning site
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo triacetic acid
nm	Nanometer

OD ₅₇₈	optische Dichte bei 578 nm
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Ser	Serin
SEM	Standard Error of the Mean
Src	sarcoma
TAE	Trisacetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TB-Medium	<i>Terrific Broth</i> -Medium
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolette Licht
V	Volt
YPDA	yeast peptone dextrose adenine
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid

PUBLIKATIONSLISTE

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen hervorgegangen:

L-selectin associates with the cellular protein phosphatase inhibitor PhapII in a phosphorylation-dependent manner.

Figen Beceren-Braun*, Karin Killian*, Rudolf Volkmer, Jens Dervedde, Rudolf Tauber
PLoS ONE, 2012; [manuscript submitted]

Sequence-Defined Glycopolymer Segments Presenting Mannose: Synthesis and Lectin Binding Affinity.

Daniela Ponader, Felix Wojcik, **Figen Beceren-Braun**, Jens Dervedde, Laura Hartmann
Biomacromolecules, 2012; PMID: 22483345

L-Selectin - A dynamic regulator of leukocyte migration.

Stefanie Wedepohl, **Figen Beceren-Braun**, Sebastian Riese, Konrad Buscher, Sven Enders, Gesche Bernhard, Karin Kilian, Véronique Blanchard, Jens Dervedde, Rudolf Tauber

Eur J Cell Biol., 2012; PMID: 21546114

The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins.

Aleander Weng, Mayank Thakur, **Figen Beceren-Braun**, Diana Bachran, Christopher Bachran, Sebastian B. Riese, Kristina Jenett-Siems, Roger Gilabert-Oriol, Matthias F. Melzig, Hendrik Fuchs

Mol Oncol., 2012; PMID: 22309811

Site-selective modification of proteins for the synthesis of structurally defined multivalent scaffolds.

Lukas M. Artner, Lars Merkel, Nina Bohlke, **Figen Beceren-Braun**, Christoph Weise, Jens Dervedde, Nediljko Budisa, Christian P. R. Hackenberger

Chem Commun (Camb.), 2012; PMID: 22068135

SNARE motif-mediated sorting of synaptobrevin by the endocytic adaptors CALM and AP180 at synapses.

Seong Koo, Stefan Markovic, Dmytro Puchkov, Carsten Mahrenholz, **Figen Beceren-Braun**, Jens Dervedde, Rudolf Volkmer-Engert, Hartmut Oschkinat, Volker Haucke

PNAS, 2011; PMID: 21808019

DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Tauber für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit bedanken. Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Lockau bedanke ich mich für die Vertretung gegenüber der Humboldt-Universität und Prof. Dr. Werner Reutter für die begeisterte Aufnahme der weiteren Begutachtung.

Ein ganz besonderer Dank gilt an Dr. Karin Kilian für die Einführung in das Thema und die Betreuung während der Zeit in unserem Institut. Dr. Jens Dervedde danke ich für jegliche Hilfen im Labor und seinem professionellem Rat in allen wissenschaftlichen Fragen. Für die tatkräftige Unterstützung im Labor und den regen wissenschaftlichen Diskussion möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Stefanie Wedepohl, Sebastian Riese, Dr. Sven Enders, Dr. Paul Ojiambo Wafula, Dr. Thomas Hug und Christian Kühne bedanken. Sie sorgten stets für ein sehr angenehmes und freundschaftliches Arbeitsklima. Allen anderen Kollegen, Gästen und ehemaligen Kollegen des Instituts möchte ich mich für jede Hilfe im Labor ebenfalls bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Mann und meinen Freunden bedanken, die während meiner Doktorzeit immer für mich da waren und nicht zuletzt meinen Eltern und Ulrika für ihren außerordentlichen Beitrag in meine Ausbildung.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Figen Beceren-Braun, an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen habe.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 8. November 2011

Figen Beceren-Braun